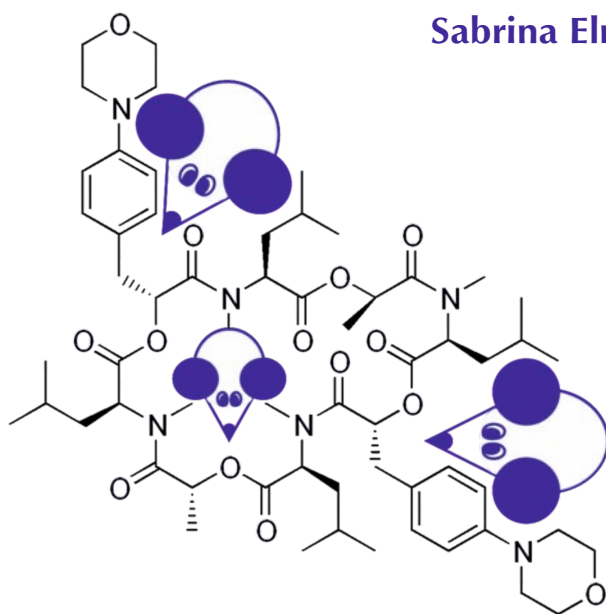


Neurotoxizität von Emodepsid in Abhängigkeit der MDR1-Expression in der Blut-Hirn-Schranke

Sabrina Elmshäuser



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

Neurotoxizität von Emodepsid in Abhängigkeit der MDR1-Expression in der Blut-Hirn-Schranke

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sabrina Elmshäuser

Tierärztin

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Geyer

2. Gutachter: PD Dr. Ch. Rummel

Tag der Disputation: 19. März 2015

**Für all meine tapferen kleinen Mäuse, die noch so viel
mehr für diese Arbeit geopfert haben als ich –
ihr seid die wahren Helden dieser Geschichte**

*„Du bist zeitlebens für das verantwortlich,
was du dir vertraut gemacht hast“*

*- Der kleine Prinz -
(Antoine de Saint-Exupéry)*

Teile dieser Arbeit wurden bereits wie folgt publiziert

Originalarbeiten

Elmshäuser, S.; Straehle, L.C.; Kranz, J.; Krebber, R.; Geyer, J. (2014) Brain penetration of emodepside is increased in P-glycoprotein-deficient mice and leads to neurotoxicosis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*; 2014 Aug 1. doi: 10.1111/jvp.12149. [Epub ahead of print].

Elmshäuser, S.; Wilke, A.; Geyer, J. (2014) Arzneimittelunverträglichkeiten nach Gabe von Emodepsid/Praziquantel (Profender®) bei Hunden mit MDR1-Gendefekt. *Kleintierpraxis*; 59, (11), 597-605

Kongressbeiträge

Elmshäuser, S.; Geyer, J. (2013) Brain penetration of emodepside is increased in P-glycoprotein deficient mice and leads to neurotoxicosis. Vortrag auf dem 23. *Vetpharm-Symposium*, 12./13. September 2013, Gießen

Elmshäuser, S.; Straehle, L.C.; Kranz, J.; Krebber, R.; Geyer, J. (2014) Emodepside and P-Glycoproteine: in vitro and in vivo interaction studies, and clinical consequences. Vortrag und Poster auf dem *Symposium on Veterinary Drug Metabolizing Enzymes and Drug Transporters (VDME/DT)*, 25. September 25th 2014, Gießen.

Diese Arbeit wurde gefördert durch die BAYER Animal Health GmbH

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	Emodepsid	- 1 -
1.1.1	Chemie	- 1 -
1.1.2	Präparate	- 2 -
1.1.3	Wirkmechanismus	- 3 -
1.1.4	Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender®	- 4 -
1.2	Die Blut-Hirn-Schranke	- 5 -
1.2.1	MDR1-Transporter und MDR1-Defekt.....	- 6 -
1.3	Übersicht Pharmakokinetik	- 7 -
1.3.1	Interindividuelle Unterschiede	- 8 -
1.3.2	Weitere Einflussgrößen	- 8 -
1.3.3	Pharmakokinetische Daten von Emodepsid.....	- 9 -
1.4	Zielsetzung der Arbeit	- 10 -
1.4.1	Auswertung der Arzneimittelunverträglichkeiten nach Anwendung von Profender® beim Hund.....	- 10 -
1.4.2	<i>In vitro</i> Transportstudien von Emodepsid.....	- 10 -
1.4.3	Gewebeverteilung von Emodepsid.....	- 10 -
1.4.4	Neurotoxizität von Emodepsid.....	- 10 -
1.4.5	Gesamtziel.....	- 11 -
2	MATERIAL UND METHODEN	- 12 -
2.1	Auswertung der dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie gemeldeten Fälle von Arzneimittel-unverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® beim Hund.....	- 12 -
2.1.1	MDR1-Diagnostik	- 12 -
2.1.2	MDR1-Vigilanzsystem	- 13 -
2.1.3	Sonstige Fälle und weiteres Vorgehen.....	- 13 -
2.2	Testsubstanz.....	- 13 -
2.3	<i>In vitro</i> Transport von Emodepsid	- 13 -
2.3.1	Zellkulturmodell	- 13 -
2.3.2	Rhodamin123 Efflux Assay	- 14 -
2.3.3	Messung von Fluoreszenz und Proteingehalt	- 16 -
2.3.4	Material	- 18 -
2.4	<i>In vivo</i> Versuche	- 20 -
2.4.1	Versuchstiere.....	- 20 -

2.4.2	Gewebeverteilung von Emodepsid.....	- 22 -
2.4.3	Messung der Neurotoxizität von Emodepsid.....	- 23 -
2.4.4	Materialien	- 25 -
2.5	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	- 26 -
2.6	Auswertung	- 27 -
2.6.1	Graph Pad Prism	- 27 -
3	ERGEBNISSE	- 28 -
3.1	Auswertung der dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie gemeldeten Fälle von Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® beim Hund.....	- 28 -
3.1.1	Symptome.....	- 28 -
3.1.2	Rasseverteilung.....	- 30 -
3.1.3	MDR1-Genotypverteilung	- 30 -
3.1.4	Fütterungszustand und Dosierung	- 31 -
3.1.5	Geschlecht.....	- 32 -
3.2	<i>In Vitro</i> Transport von Emodepsid.....	- 32 -
3.2.1	Funktionsfähigkeit des gewählten Modells.....	- 32 -
3.2.2	Interaktion von Emodepsid mit dem caninen MDR1-Transporter	- 33 -
3.2.3	Vergleich mit Verapamil.....	- 34 -
3.3	Gewebeverteilung von Emodepsid.....	- 35 -
3.4	Neurotoxizität von Emodepsid.....	- 37 -
3.4.1	PGP ^{mut} Mäuse	- 38 -
3.4.2	PGP ^{WT} Mäuse.....	- 39 -
3.4.3	Vergleich beider Gruppen.....	- 39 -
4	DISKUSSION.....	- 41 -
4.1	Interaktion von Emodepsid mit dem caninen MDR1-Transporter	- 41 -
4.2	Einflüsse auf die Verträglichkeit von Profender® Tabletten für den Hund	- 43 -
4.2.1	MDR1-Genotyp, Rasse, Dosierung, Fütterungszustand, Geschlecht.....	- 43 -
4.2.2	Weitere Anmerkungen.....	- 46 -
4.3	Symptomatik und mutmaßlicher Toxizitätsmechanismus	- 47 -
4.4	Wirkung von Emodepsid in MDR1-defekten Mäusen	- 58 -
4.4.1	Rückblickende Beurteilung des gewählten Modells.....	- 60 -

5	ZUSAMMENFASSUNG	- 69 -
5	SUMMARY	- 70 -
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	- 71 -

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Strukturformel von Emodepsid	S. 01
Abb. 2	Funktion des MDR1-Transporters in der Blut-Hirn-Schranke	S. 06
Abb. 3	Laufperformance einer Maus auf dem Rotarod (Training)	S. 24
Abb. 4	Laufperformance einer Maus auf dem Rotarod (nach Applikation einer neurotoxischer Substanz)	S. 25
Abb. 5	Arzneimittelunverträglichkeiten nach Profender® Anwendung beim Hund	S. 27
Abb. 6	Rasseverteilung der Arzneimittelunverträglichkeiten nach Profender® Anwendung beim Hund	S. 29
Abb. 7	Genotypverteilung der Arzneimittelunverträglichkeiten nach Profender® Anwendung beim Hund	S. 30
Abb. 8	Vergleich der Fluoreszenz zwischen nicht-induzierten und induzierten Zellen	S. 32
Abb. 9	Dosisabhängige Fluoreszenz mit steigenden Konzentrationen Emodepsid	S. 33
Abb. 10	Dosisabhängige Fluoreszenz mit steigenden Konzentrationen Verapamil	S. 34
Abb. 11	Emodepsid Konzentrationen in verschiedenen Geweben der Maus nach Appl. von 1 mg/kg	S. 35
Abb. 12	Darstellung der Emodepsid Konzentration in Gehirn der PGP ^{mut} Mäuse	S. 35
Abb. 13	Laufperformance der PGP ^{mut} Mäuse nach Appl. von 1 mg/kg Emodepsid	S. 38
Abb. 14	Laufperformance der PGP ^{WT} Mäuse nach Appl. von 1 mg/kg Emodepsid	S. 39
Abb. 15	Verteilung der AOC _(%) bei PGP ^{mut} und PGP ^{WT} Mäusen	S. 39

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Rasseverteilung des MDR1-Defekts	S. 07
Tab. 2	Belegung einer 24-well Platte	S. 14
Tab. 3	Gewebeverteilung der murinen mdrl-Isoformen	S. 21
Tab. 4	Bewertungsschema Rotarod Setup	S. 24
Tab. 5	Symptome der Arzneimittelunverträglichkeiten nach Profender® Anwendung beim Hund	S. 28
Tab. 6	Durchschnittliche Emodepsid Konzentration in verschiedenen Geweben bei der Maus (nach Applikation von 1 mg/kg)	S. 36
Tab. 7	Verhältnis der Gehirn- und Plasmakonzentrationen zwischen PGP ^{mut} und PGP ^{WT} Mäusen	S. 36

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin/Serotonin
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding-cassette</i>
ACh	Acetylcholin
AOC	<i>area over the curve</i>
AS	Arzneistoff
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines Serumalbumin
BVL	Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CuSO₄	Kupfersulfat
CVO	Circumventrikuläres Organ
D	Dopamin
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
Diss.	Dissertation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA/EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (bis 2009)/ European Medicines Agency (seit 2009)/ europäische Arzneimittelagentur
EMO	Emodepsid (PF1022-221, Bay 44-4400)
EMPRESS	European Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens
FLP	FMRFamide like neuropeptide
FKS	fetales Kälberserum
GABA	γ-Aminobuttersäure
HP	Hemmstoffpuffer
K⁺-Na⁺-Tartrat	Kalium-Natrium-Tartrat
KO	Knockout
LAT-1	Latrotoxin 1 Rezeptor
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatografie-Tandemmassenspektrometrie
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification (Validierungsgrenze)
LTX	Latrotoxin
MDR1	multi-drug-resistance Transporter 1 (syn. P-Glycoprotein)
NA	Noradrenalin
Na₂CO₃	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
p.o.	peroral
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PD	Pharmakodynamik
PGP/P-gp	P-Glycoprotein (syn. MDR1)

PK	Pharmakokinetik
PZQ	Praziquantel
Rh123	Rhodamin 123
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
SP	Substratpuffer
SPF	spezifiziert Pathogen-frei
Tab.	Tabelle
Tet	Tetrazyklin
- Tet	nicht Tetrazyklin induzierte Zellen
+ Tet	Tetrazyklin induzierte Zellen
VER	Verapamil
Vk	Variationskoeffizient
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Emodepsid

Parasitäre Erkrankungen stellen weltweit ein großes Problem für Mensch und Tier dar. Aufgrund weit verbreiteter Resistenzen gegenüber vielen Antiparasitika ist es von großer Wichtigkeit neue antiparasitäre Wirkstoffe zu entwickeln.

Ein solch vergleichsweise neuer Wirkstoff ist Emodepsid (EMO), ein halbsynthetisches Derivat des Metaboliten PF1022A aus dem Pilz *Mycelia sterilia* (*Rosallina* spp.) (Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2002; Harder et al., 2005). Es wird eingesetzt zur Therapie verschiedener gastrointestinaler Nematoden inklusive einiger Larvenstadien (EMA, 2005, 2008).

Da die Eigenschaften von EMO und seiner Ausgangssubstanz PF1022A einander weitestgehend entsprechen, wird im Folgenden der Einfachheit halber immer der Begriff EMO verwendet, obwohl in einigen zitierten Studien auch PF1022A eingesetzt oder diskutiert wurde.

1.1.1 Chemie

Beim Wirkstoff EMO handelt es sich um ein zyklisches Oktadepsipeptid. Im Vergleich zur Ausgangssubstanz PF1022A besitzt es zwei zusätzliche Morpholinringe, welche die Löslichkeit und damit die orale Bioverfügbarkeit erhöhen (Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2002).

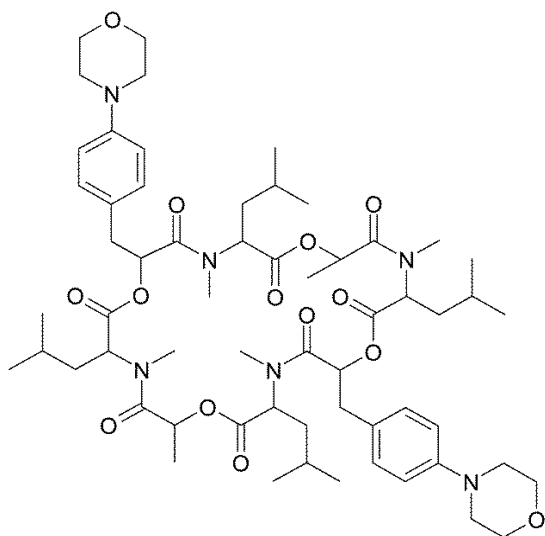


Abb.1) Strukturformel von EMO

Dennoch ist es eine sehr lipophile Substanz, die mit einem logP Wert¹ von 4,9 praktisch unlöslich in Wasser ist ($< 0.00001 \text{ g/l}$) (*Emodepsid Sicherheitsdatenblatt, 2010; Lange, 2011*). Die Reinsubstanz ist ein weiß bis leicht gelbliches Pulver mit hygroskopischen Eigenschaften. Seine Summenformel lautet $\text{C}_{60}\text{H}_{90}\text{N}_6\text{O}_{14}$ und sein Molekulargewicht beträgt 1119,42 g. Es existieren 4 verschiedene kristalline Formen von EMO, die sich in ihrer Bioverfügbarkeit leicht unterscheiden. Hauptsächlich liegt aber die Form I vor (>99%) (*Lange, 2011*). Form II – IV sind Hydrate, in denen unterschiedlich viele H_2O Moleküle in das Kristallgitter eingelagert sind, Form I absorbiert nur wenig Wasser. Beim Erhitzen verdunsten die H_2O Moleküle und die Substanz verliert an Gewicht. Die kristalline Struktur verändert sich durch den Wasserverlust nicht (*Baronsky et al., 2009*).

1.1.2 Präparate

EMO ist in den Präparaten Profender® (in Kombination mit Praziquantel (PZQ)) und Procox® (in Kombination mit Toltrazuril) enthalten und zugelassen. Es wird im Fall von Profender® bei der Katze als Spot-On Präparat in der Mindestdosierung 3 mg/kg und beim Hund peroral in der Mindestdosierung 1 mg/kg eingesetzt.

Als Profender® für die Katze ist es bereits seit 2005 als Spot-On Formulierung auf dem Markt. Als Tabletten für den Hund erfolgte die Markteinführung 2008 zunächst für kleine (3 mg EMO + 15 mg PZQ) und 2009 auch für mittlere (10 mg EMO + 50 mg PZQ) und große (30 mg EMO + 150 mg PZQ) Hunde. Das Präparat Procox® (0,9 mg/ml EMO + 18 mg/ml Toltrazuril) ist seit 2011 kommerziell erhältlich und dient der Therapie von Giardien und Nematoden speziell bei Hundewelpen.

Die Profender® Tabletten können jeweils geteilt werden, sodass die absolute Mindestdosis bei der Anwendung 1,5 mg EMO (+ 7,5 mg PZQ) entspricht.

Die Tabletten sind so formuliert, dass der Wirkstoff über einen längeren Zeitraum kontinuierlich freigesetzt wird (Retardformulierung). Da eine Aktivierung der Verdauung die Freisetzung beschleunigt und durch den dadurch ebenfalls erhöhten Plasmaspiegel der Wirkstoffe das Risiko unerwünschter Arzneimittelwirkungen steigt, darf Profender® nur bei

¹ Der P-Wert ist ein anderer Begriff für den Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und beschreibt das Konzentrationsverhältnis einer Substanz in einem Zweiphasen-System. Dabei ist eine Phase lipophil (Oktanol) und eine hydrophil (Wasser). Der P-Wert ist damit ein Maß für die Hydrophilie bzw. Lipophilie einer Substanz. Liegt er über 1, ist die Substanz besser fettlöslich, liegt er unter 1, ist sie besser wasserlöslich. Der logP-Wert ist daher positiv für lipophile Substanzen und negativ für hydrophile Substanzen.

nüchternen Tieren angewendet werden. Der Zulassungsinhaber empfiehlt, den Hund über Nacht fasten zu lassen, die Behandlung am Morgen durchzuführen und das Tier frühestens 4 Stunden im Anschluss wieder zu füttern. Da das Präparat Rindfleisch-Aroma erhält, wird es im Normalfall auch ohne zusätzliches Futter gut von den Tieren angenommen (EMEA, 2008).

1.1.3 Wirkmechanismus

Der Wirkmechanismus von EMO scheint äußerst komplex zu sein und konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Da die Substanz allerdings auch gegen multiresistente Parasitenstämme sehr effektiv ist (Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2002; Harder et al., 2005; von Samson-Himmelstjerna et al., 2005), kann von einer völlig neuartigen Wirkung ausgegangen werden. Entsprechende Informationen beziehen sich allerdings in aller Regel auf Invertebraten, eine Übertragung der Erkenntnis auf Säugetiere ist dabei nicht ohne weiteres möglich.

In den Parasiten führt EMO zur Paralyse des Pharynx und der Muskulatur, zum Sistieren der Eiablage und zu verzögerter Entwicklung (Bull et al., 2007; Martin et al., 2011; Krücken et al., 2012). Dabei sind mehrere Rezeptoren beteiligt. Zum einen bindet EMO an den sogenannten Latrotoxin-Rezeptor 1 (LAT-1) (Saeger et al., 2001), zum anderen an bestimmte Calcium-abhängige Kalium Kanäle, die sogenannten SLO-1-Kanäle (Guest et al., 2007; Holden-Dye et al., 2007). Auch der GABA_A-Rezeptor stellt eine weitere Zielstruktur dar. Der über GABA_A-Rezeptoren vermittelte Effekt scheint klinische allerdings von untergeordneter Bedeutung zu sein (Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2002; Harder et al., 2005; Miltch et al., 2012).

LAT-1 kommt im Invertebraten hauptsächlich in den Neuronen des Pharynx vor und behindert bei Stimulation die Nahrungsaufnahme durch Hemmung der Pharynxpumpe. Dabei kommt es zur Ausschüttung inhibitorischer Neurotransmitter (Willson et al., 2003, 2004; Harder et al., 2005; Welz et al., 2005; Krüger et al., 2009). In Vertebraten werden homologe Rezeptoren vor allem im Gehirn, aber in geringerem Umfang auch in nahezu allen anderen Geweben exprimiert (Welz et al., 2005; Martinez et al., 2011) und binden das im Gift der Schwarzen Witwe (*Latrodectus* spp.) enthaltene Latrotoxin, welches ebenfalls zur einer massiven Ausschüttung von Neurotransmittern führt (Harder et al., 2005; Guest et al., 2007; Krüger et al., 2009).

Da LAT-1 Knockout (KO) Organismen weiterhin sensitiv auf die Wirkungen von EMO an der somatischen Muskulatur sind, muss es jedoch noch mindestens einen weiteren Angriffspunkt dieser Substanz geben (Holden-Dye et al., 2007; Guest et al., 2007). Es wird davon ausgegangen, dass EMO zusätzlich an SLO-1-Kanäle bindet. Dabei handelt es sich um weit verbreitete Calcium-abhängige Kalium-Kanäle, welche unter anderem an der Muskelkontraktion und der Regulation des Myotonus beteiligt sind. SLO-1-Kanäle können außer durch Calcium (Ca²⁺) auch durch Spannung aktiviert werden. Sie kommen sowohl prä- als auch postsynaptisch vor und wirken in beiden Fällen durch negative Rückkopplung inhibitorisch auf die Freisetzung

von Acetylcholin (ACh). Da EMO keine Wirkung auf denervierte Muskeln hat, kann davon ausgegangen werden, dass es auch hier hauptsächlich an präsynaptischen SLO-1-Kanälen wirkt und primär die Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter vermindert. Fehlen diese SLO-1-Kanäle, sind Parasiten gegen alle Wirkungen von EMO (an Pharynx und Muskulatur) resistent (*Holden-Dye et al., 2007; Guest et al., 2007*). Auch für SLO-1-Kanäle existiert ein Homolog im Vertebraten: die so genannten BK-Kanäle (BK = Big K = viel Kalium). Auch diese greifen präsynaptisch in die Neurotransmitterfreisetzung ein. Dabei wird die Freisetzung je nach Synapse verstärkt oder vermindert (*Guest et al., 2007; Holden-Dye et al., 2007*). BK-Kanäle der Vertebraten sind um den Faktor 10 – 100 weniger sensitiv gegenüber der Wirkung von EMO als die SLO-1-Kanäle der Parasiten (*Crisford et al., 2011*).

Die vermutete über LAT-1 vermittelte weiterführende Signalkaskade läuft über die Phospholipase C (PLC), die aus Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP₂) die sekundären Botenstoffe Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) bildet, welche zur Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern und zur Exozytose führen. Das freigesetzte Ca²⁺ könnte wiederum die SLO-Kanäle aktivieren, sodass beide Zielstrukturen in einigen Geweben (Pharynx) interagieren (*Holden-Dye et al., 2007; Guest et al., 2007*).

Die verschiedenen Rezeptorsysteme sind also offenbar für die Wirkung von EMO unterschiedlich entscheidend, vermutlich in folgender Reihenfolge: SLO-1 > LAT-1 > GABA_A (*Miltsch et al., 2012*).

1.1.4 Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender®

Alle Angaben zum Wirkmechanismus von EMO beziehen sich nahezu ausschließlich auf Invertebraten. Zu möglichen (zusätzlichen) Wirkungen in den Zieltierarten ist bisher nichts bekannt. In einer Studie wurde die Wirkung von EMO an isolierten Zellen und Geweben von Säugern untersucht. Dabei konnte bereits in sehr geringen Dosen eine Porenbildung in den Zellmembranen nachgewiesen werden, zu Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentration kam es allerdings erst in sehr hohen Dosierungen, welche keine zytotoxischen Effekte hervorriefen. In diesen hohen Konzentrationen zeigte sich eine verringerte Kontraktilität des Ileums (isoliert aus Meerschweinchen). In ebenfalls sehr hohen Dosen führte EMO zur Induktion der Apoptose und zu einer Blockade des Zellzyklus. Die eingesetzten Dosen lagen dabei weit über den antiparasitären, eine kurze Exposition bei niedriger Dosierung wie sie zur Therapie von Helminthosen verwendet wird, führte zu einer Proliferation der Tumorzelllinie BK-3-1 (*Dornetshuber et al., 2009*).

Eine weitere Studie beschreibt die Selektivität von EMO für die entsprechenden Zielstrukturen in Invertebraten. Modelorganismen (*C. elegans*), die das humane Homolog der SLO-1-Kanäle exprimierten, zeigten eine 10- bis 100-fach geringere Sensitivität für EMO (*Crisford et al., 2011*). Die Säugertoxizität von EMO wird daher allgemein als gering eingestuft.

Aus der tierärztlichen Praxis wurde in den letzten Jahren allerdings von Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® beim Hund berichtet. Dabei fiel auf, dass zum überwiegenden Anteil Hunde betroffen sind, die den so genannten MDR1-Defekt (siehe 1.2.1) aufweisen, obwohl Profender® in präklinischen Studien auch an solchen Tieren getestet und diese in die Zulassung mit eingeschlossen wurden.

1.2 Die Blut-Hirn-Schranke

Das Gehirn als wichtigstes Organ des Körpers wird durch eine Reihe struktureller und funktioneller Besonderheiten geschützt, die als Blut-Hirn-Schranke (BHS) bezeichnet werden. Den wichtigsten Anteil daran haben die Endothelzellen der Gehirnkapillaren, die sich in mehreren Punkten von den Endothelzellen anderer Kapillaren im Körper deutlich unterscheiden. Zum einen sind diese besonders dicht und besonders eng miteinander verbunden (= kontinuierliches Endothel mit *tight junctions*). Andererseits weisen sie weniger Pinozytose-Vesikel aber mehr Mitochondrien sowie metabolisierende Enzyme auf, sodass grundsätzlich weniger Substanzmenge aus dem Blut in die Zellen aufgenommen wird, die Stoffe in der Zelle aber bereits metabolisiert werden können. Des Weiteren sind die Endothelzellen der Gehirnkapillaren mit einer Reihe von Transportern und Rezeptoren ausgestattet. Zur Entwicklung des Endothels sowie zur Aufrechterhaltung der physiologischen Funktion sind außerdem Astrozyten, Perizyten und Mikroglia am Aufbau der BHS beteiligt. So kann einerseits der Übertritt potenziell schädlicher Substanzen ins zentrale Nervensystem (ZNS) verhindert, andererseits die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen gewährleistet werden (Risau und Wolburg, 1990; Wolf et al., 1996; Rubin und Staddon, 1999; Ballabh et al., 2004; Abbott et al., 2010).

Für den Menschen ist für einige neurologische Krankheitsprozesse eine gestörte Funktion der BHS bekannt, beispielsweise bei Parkinson, Multipler Sklerose oder Alzheimer (Risau und Wolburg, 1990; Rubin und Staddon, 1999; Ballabh et al., 2004; Abbott et al., 2010).

Auch sind einige Bereiche des Gehirns von diesem Schutz durch die BHS ausgenommen. Diese Bereiche werden als Circumventrikuläre Organe (CVO) bezeichnet. In der *Area postrema* beispielsweise gelangen Schadstoffe in die Struktur des Brechzentrums. Als Reaktion darauf wird hier Erbrechen ausgelöst, um diese wieder aus dem Körper zu eliminieren. Weiterhin werden in der Neurohypophyse Hormone produziert und ins Blut abgegeben, was bei intakter BHS in dieser Region schwierig wäre. Weitere Gehirnareale ohne BHS sind die Epiphyse, die *Eminentia mediana*, das *Organum vasculosum laminae terminalis* und das *Organum subfornicale* (Risau und Wolburg, 1990; Ballabh et al., 2004).

1.2.1 MDR1-Transporter und MDR1-Defekt

Ein wichtiger Bestandteil der BHS ist der so genannte MDR1-Transporter (*multi-drug-resistance* Transporter 1, auch P-Glycoprotein bzw. PGP/P-gp genannt). Er gehört zur Gruppe der ABC-Transporter (ATP-binding-cassette Transporter), ist also in seiner Funktion auf ausreichend vorhandene Energie in Form von ATP angewiesen.

Seine wichtigste Aufgabe ist der Schutz des ZNS vor potenziell toxischen Stoffen, indem er lipophile Substanzen aus dem Gehirn zurück ins Blut transportiert. Zusätzlich wird MDR1 vor allem im Darmepithel, der Leber und in den Nieren exprimiert und vermindert hier die Absorption und fördert die Exkretion verschiedener sowohl endo- als auch exogener Stoffe.

Bisher sind mehr als 100 Arzneistoffe unterschiedlichster Arzneistoffgruppen bekannt, welche von MDR1 transportiert werden (MDR1-Substrate) oder diesen Transporter inhibieren (MDR1-Inhibitoren) (Fromm, 2000).

Beim sogenannten MDR1-Defekt (offizielle Bezeichnung: MDR1 nt230(del4) Mutation) kommt es bei der Bildung des entsprechenden Proteins durch eine 4-Basenpaardeletion im MDR1-Gen zu einer Verschiebung des Leserahmens, wodurch ein vorzeitiges Stopp-Codon gebildet wird. Dies führt zu einem vollständigen Funktionsverlust des Transporters (Mealey et al., 2001). Bei betroffenen Hunden kommt es dadurch zu einem (vermehrten) Übertritt von MDR1-Substraten ins Gehirn und – je nach Wirkstoff - zum vermehrten Auftreten teilweise gravierender Arzneimittelunverträglichkeiten. Besonders bekannt ist dies für die makrozyklischen Laktone (Ivermectin, Moxidectin u.a.), eine weitere Gruppe von Antiparasitika.

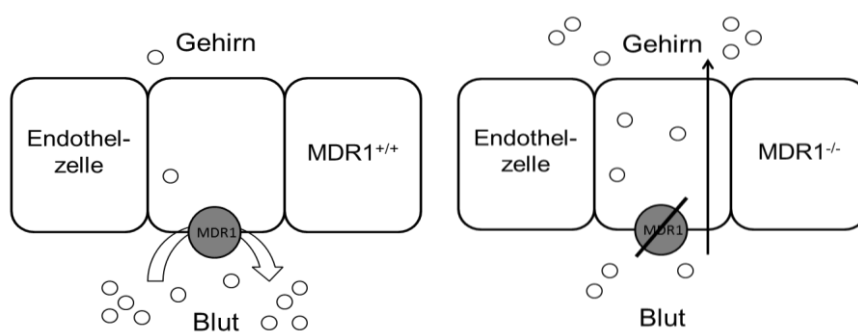


Abb.2) Funktion des MDR1 Transporters in der BHS sowie Darstellung der Situation beim Hund mit MDR1-Defekt. Kreise stellen MDR1-Substrate dar. Beim Vorhandensein von MDR1 in der BHS werden MDR1-Substrate aus den Endothelzellen der Gehirnkapsillaren unter Energieaufwand zurück ins Blutkompartiment gepumpt. Fehlt MDR1 in der BHS, können MDR1-Substrate diese ungehindert passieren und reichern sich zum Teil sogar im ZNS an.

Vom MDR1-Defekt betroffen sind nach aktuellem Stand 14 verschiedene Hüte- und Windhund-Rassen (sowie deren Mischlinge). Dabei kann die MDR1 nt230(del4) Mutation auf einem oder beiden Allelen vorliegen. Sind beide Allele betroffen, wird der entsprechende Genotyp als MDR1^{-/-} bezeichnet. Betrifft die Mutation lediglich ein Allel, ist der Defekt nur heterozygot ausgeprägt und der Genotyp wird mit MDR1^{+/-} angegeben. Nicht betroffene Tiere werden als MDR1^{+/+} beschrieben (Geyer et al., 2005a, 2005b; Mealey und Meurs, 2008; Gramer et al., 2011).

Tab. 1) Vorkommen der MDR1 nt230(del4) Mutation bei verschiedenen Hunderassen weltweit (nach Gramer et al., 2011).

Weltweite Rasseverteilung der MDR1 nt230(del4) Mutation	Frequenz des MDR1 (-) Allels in %
Kurzhaar-Collie	68
Langhaar-Collie	55 – 57
Longhaired Whippet	42 – 65
Miniatur Australian Shepherd	20 – 50
Shetland Sheepdog/Sheltie	7 – 35
Silken Windhound	18 – 30
Australian Shepherd	17 – 46
McNab	17 – 30
Wäller	17 – 19
Weißer Schäferhund	14
Altenglischer Schäferhund/Bobtail	1 – 11
Englischer Schäferhund	7 – 15
Deutscher Schäferhund	6 – 10
Border Collie	1 - 2
Hütehund-Mischlinge	6 – 7
andere Mischlinge	2 - 7

Auch EMO ist ein Substrat des MDR1-Transporters. Dadurch ist die therapeutische Breite bei MDR1-defekten Hunden reduziert. Während normaler Weise erst bei bis zu 5-facher Überdosierung gelegentlich Arzneimittelunverträglichkeiten auftreten, zeigten sich bei MDR1^{-/-} Hunden (Collies) bereits bei der doppelten empfohlenen Mindestdosierung leichte klinische Symptome (EMA, 2005).

1.3 Übersicht Pharmakokinetik

Die Wirkung eines Arzneistoffes (AS) im Körper setzt sich zusammen aus Pharmakodynamik (PD) und Pharmakokinetik (PK). Während unter PD alle Einflüsse des AS auf den Körper zusammengefasst werden, beschreibt die PK alle Einflüsse des Körpers auf den AS. Konkret versteht man unter PK die Freisetzung, die Absorption, die Verteilung, den Metabolismus und die Exkretion eines AS. Diese Vorgänge sind unter anderem abhängig von der Größe

und Lipophilie/Hydrophilie des AS sowie von seiner Galenik und Applikationsart. So werden lipophile Substanzen in der Regel leichter aus dem Darm resorbiert, aber auch schlechter wieder ausgeschieden, sodass die Gefahr einer Akkumulation im Körper, vor allem im Fettgewebe, besteht. Das Gehirn ist vor einer solchen Anreicherung durch die BHS, insbesondere durch den MDR1-Transporter, geschützt (Derendorf et al., 2011).

1.3.1 Interindividuelle Unterschiede

Die gleiche Dosis eines AS kann zu unterschiedlichen Effekten führen. Dafür kommen verschiedene Ursachen in Frage.

Da abhängig von der Körperkonstitution (Größe, Gewicht) der relative Anteil an Gesamtkörperwasser variiert, wirkt sich dies auf das Verteilungsvolumen eines AS aus.

Viele physiologische Prozesse im Körper sind zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht völlig ausgereift und unterliegen im Alter zunehmender Degeneration. Beides hat ebenfalls Einfluss auf die Verteilung, den Metabolismus und die Exkretion von AM (Modric und Martinez, 2010; Derendorf et al., 2011).

Krankheiten können die Einflussgrößen der PK (und PD) auf vielfältige Weise verändern. Am wichtigsten dabei sind Erkrankungen der Leber und der Nieren, vor allem Leber- und/oder Niereninsuffizienz (Sabnis 1999; Derendorf et al., 2011).

Einer der wichtigsten Gründe für interindividuelle Unterschiede in der Wirkung von AS sind aber Polymorphismen in Rezeptoren, Transportern (Bsp.: MDR1-Defekt) und metabolisierenden Enzymen (Modric und Martinez, 2012; Derendorf et al., 2011).

1.3.2 Weitere Einflussgrößen

Die Absorption eines AS wird auch beeinflusst durch die Futteraufnahme. Diese Effekte von Futter sind vielseitig und daher oft schwer vorhersehbar.

Die Löslichkeit lipophiler AM wird beispielsweise durch fettreiches Futter erhöht.

Auch der individuelle Magen pH-Wert spielt eine Rolle für viele saure oder basische AS (Sabnis, 1999; Sagawa et al., 2009; Bhattachar et al., 2011).

Die Zeit bis zur vollständigen Magenentleerung sowie die Dauer der Magen-Darm-Passage sind interindividuell sehr verschieden. Dadurch kann auch die Resorptionsgeschwindigkeit eines AS variieren (Sabnis 1999; Sagawa et al., 2009).

Eine Verbindung mit endogenen Stoffen wie Gallensäuren oder Cyclodextrinen kann die Löslichkeit eines AS erhöhen oder vermindern.

Die Verteilung eines AS hängt weiterhin davon ab, ob es sich in bestimmten Kompartimenten oder Organen besonders anreichert. Darunter versteht man sowohl eine hohe Plasmaproteinbindung als auch die Ablagerung in bestimmten Körpergeweben wie Fett oder Knochen (Depot). An Plasmaproteine gebundene AS sind inaktiv, da sie weder an ihren

Wirkort gelangen noch metabolisiert und ausgeschieden werden können. Im Fett gespeicherte AS werden langsam wieder frei gesetzt, sodass sich die Wirkdauer verlängern kann (*Modric und Martinez, 2010; Derendorf et al., 2011*).

1.3.3 Pharmakokinetische Daten von Emodepsid

Im Fall von EMO wurde die PK an Ratten nach intravenöser Applikation untersucht, wobei gezeigt wurde, dass EMO in alle Organe verteilt wird mit der größten Menge im Fettgewebe. Ausgeschieden wird EMO hauptsächlich unverändert über die Fäzes; weitere Ausscheidungsprodukte sind hydroxylierte Derivate. Die Hälfte der applizierten Dosis wurde schnell ausgeschieden (innerhalb von 24 h), während der Rest sehr lange im Körper verweilte und teilweise noch nach 168 h nachgewiesen werden konnte. Die errechnete Halbwertszeit lag bei 39-51 h (*EMEA, 2005*).

Die Kombination aus EMO und PZQ wurde an Hunden nach peroraler Applikation getestet und ergab eine rasche Absorption beider Substanzen. Die Halbwertszeit war mit 1,4 – 2,5 h in dieser Studie deutlich kürzer als in dem oben erwähnten Versuch an Ratten (*EMEA, 2005, 2008*).

In einem weiteren Versuch wurden Beagle mit 1,9 mg/kg EMO (und 9,4 mg/kg PZQ) behandelt. Dabei wurde zeitgleich (Gruppe 2) oder bereits 8 Tage vorher (Gruppe 1) Imidacloprid (25 mg/kg) und Moxidectin (6,25 mg/kg) appliziert. Die maximale Plasmakonzentration für EMO konnte nach 1,5 h (Gruppe 1) bzw. 2,7 h (Gruppe 2) gemessen werden. Die Plasmakonzentrationen lagen bei 64,5 (Gruppe 2) bzw. 140,3 µg/l (Gruppe 1) (*Krüdewagen und Schimmel, 2011*), was Wechselwirkungen mit Imidacloprid und Moxidectin vermuten lässt.

Die Hauptresorptionsorte für EMO sind Duodenum und Jejunum. In den hinteren Darmabschnitten findet kaum noch eine Resorption statt (*Lange, 2011*).

In der Retardformulierung Profender® - Tabletten für den Hund, wird die Freisetzung der Wirkstoffe unter anderem beeinflusst durch den Fütterungszustand bzw. die Geschwindigkeit der Magen-Darm-Passage sowie das Vorhandensein von Gallensäuren (*EMEA, 2005, 2008; Lange, 2011*).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

1.4.1 Auswertung der Arzneimittelunverträglichkeiten nach Anwendung von Profender® beim Hund

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen gemeldeten Fälle von Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® beim Hund retrospektiv ausgewertet werden, um mögliche Zusammenhänge zum MDR1-Genotyp sowie eventuell anderen Faktoren wie Rasse, Alter, Gewicht, Geschlecht, Fütterungszustand und Dosierung aufdecken zu können.

1.4.2 *In vitro* Transportstudien von Emodepsid

Zum Nachweis, dass EMO tatsächlich mit dem MDR1-Transporter interagiert wurden Transportstudien an einer Hunde-MDR1-Zelllinie durchgeführt. Vergleichend wurde mit Verapamil (VER) ein weiteres bereits bekanntes und häufig in Transportstudien verwendetes MDR1-Substrat gemessen.

1.4.3 Gewebeverteilung von Emodepsid

Um mögliche MDR1-Genotyp abhängige Unterschiede in der Resorption und Organverteilung zu ermitteln, wurde EMO in der empfohlenen Mindestdosierung von 1 mg/kg an MDR1-defekte und MDR1-intakte Mäuse appliziert und dessen Konzentration in den wichtigsten Organen (Blut bzw. Plasma, Gehirn, Leber und Nieren) gemessen und verglichen.

1.4.4 Neurotoxizität von Emodepsid

Des Weiteren sollte unter standardisierten Bedingungen diejenige Dosierung bestimmt werden, ab welcher erstmals klinische Symptome bei MDR1-defekten Tieren auftreten und die Vergiftungssymptomatik beschrieben und quantifiziert werden. Auch für diesen Versuchsteil diente ein Mausmodell. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Entwicklung von Störungen der Motorkoordination gelegt, die häufig nach Aufnahme neurotoxischer Substanzen auftritt und die im Versuch gemessen und quantifiziert werden können. Auf diesem Wege konnte abgesehen von der MDR1-Genotyp abhängigen neurotoxischen Dosis auch die Dauer und der Schweregrad der Symptomatik ermittelt werden.

1.4.5 Gesamtziel

Insgesamt diene diese Arbeit der Aufdeckung möglicher spezifischer Risiken für eine bestimmte Gruppe von Hunden bei der Anwendung von EMO bzw. Profender®. Es wurde davon ausgegangen, dass durch die gewonnenen Ergebnisse die Therapie solcher Hunde mit EMO bzw. die allgemeine antiparasitäre Therapie dieser Tiere sicherer gestaltet werden kann.

In einem standardisierten Mausmodell sollten die in der tierärztlichen Praxis aufgetretenen Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Gabe von Profender® beim Hund nachgestellt werden, um die Wirkung von EMO im Vertebraten besser verstehen zu können. Des Weiteren sollten Hinweise auf den entsprechenden Wirk- bzw. Toxizitätsmechanismus gewonnen werden. Dies könnte in Zukunft dabei helfen, eine bessere Therapie der Symptome zu ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Auswertung der dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie gemeldeten Fälle von Arzneimittel-unverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® beim Hund

In dieser Arbeit ausgewertet wurden dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie gemeldete Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Gabe von Profender® beim Hund im Zeitraum Juni 2009 bis Mai 2013.

2.1.1 MDR1-Diagnostik

Das Institut für Pharmakologie und Toxikologie betreibt seit 2004 (seit 2007 Projektbereich Pharmakogenetische Diagnostik der TransMIT GmbH) eine eigene kommerzielle MDR1-Diagnostik. Dort können Hunde aller Rassen auf das Vorliegen der MDR1 nt230(del4) Mutation untersucht werden. Auf dem entsprechenden Antragsformular* wird unter anderem nach bereits bekannten Arzneimittelunverträglichkeiten gefragt. Auf diesem Wege wurden dem Institut im oben genannten Zeitraum insgesamt 63 Fälle von Arzneimittel-unverträglichkeiten im Zusammenhang mit Profender® bzw. EMO gemeldet.

Die Einsender wurden daraufhin kontaktiert, um die genauen Umstände der Arzneimittel-unverträglichkeiten zu erfassen. Gefragt wurde hierbei konkret nach Rasse, Gewicht, Dosierung, Fütterungszustand, Ausprägung und Dauer der Symptome sowie Therapieversuchen. Allerdings war es dennoch in vielen Fällen nicht möglich alle Parameter zu erheben, da oft keine oder unvollständige Angaben gemacht wurden. So lagen bei der Auswertung der Fälle leider in 24 Fällen keine Angaben zur Symptomatik vor. Da es sich in diesem Fall nicht um unerwünschte Arzneimittelwirkungen gemäß Definition handelt (Mindestkriterien: Tier, Arzneimittel, Symptom(e), Einsender), wurden diese Fälle von der Auswertung ausgeschlossen. Fehlten andere Angaben, wie beispielsweise Dosierung und Fütterungszustand, wurden diese Fälle in die verbliebende Gesamtzahl (n = 39) mit eingerechnet.

* (<http://www.transmit.de/mdr1-defekt>)

2.1.2 MDR1-Vigilanzsystem

Auf der Homepage des Instituts steht ein MDR1-bezogenes Vigilanzsystem zur Verfügung*, über welches ebenfalls Arzneimittelunverträglichkeiten gemeldet werden können, bei denen der Verdacht auf einen Zusammenhang zum MDR1-Genotyp bzw. MDR1-Defekt besteht. Über dieses Vigilanzsystem gingen weitere 14 Meldungen von Arzneimittelunverträglichkeiten in unserem Institut ein, davon 4 von Tierärzten und 10 von Tierbesitzern. Dabei wurden in aller Regel bereits sehr genaue Angaben zum Verlauf inkl. Symptomatik der Arzneimittelunverträglichkeiten gemacht.

* (http://www.vetmed.uni-giessen.de/pharmtox/mdr1_defekt/vigi_sys/vigi_dat_einsender.php)

2.1.3 Sonstige Fälle und weiteres Vorgehen

Ebenfalls in die Auswertung eingeschlossen wurden zwei gut dokumentierte Fälle, die direkt per E-Mail durch Tierbesitzer an Mitarbeiter des Instituts gemeldet wurden.

Alle Einsender wurden darauf hingewiesen, dass alle Arzneimittelunverträglichkeiten auch der zuständigen Bundesbehörde (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, BVL) zu melden sind.

2.2 Testsubstanz

Emodepsid (PF1022-221; Bay 44-4400) wurde von der Firma Bayer Animal Health GmbH (Leverkusen) zur Verfügung gestellt und lag als feste Reinsubstanz vor.

Die Lagerung erfolgte unter Licht- und Feuchtigkeitsausschluss bei Raumtemperatur.

2.3 *In vitro* Transport von Emodepsid

2.3.1 Zellkulturmodell

Zum Test verschiedener Substanzen auf eine Interaktion mit dem MDR1-Transporter des Hundes, wurde eine stabile Zelllinie generiert. Dazu wurde MDR1 aus der Blutprobe eines gesunden Hundes isoliert, kloniert und stabil in die kommerziell erhältliche Zelllinie Flp-In T-REx 293 (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert.

Diese Zelllinie exprimiert den Tetrazyklin-Repressor TetO₂, welcher verhindert, dass das gewünschte Gen (in diesem Fall das canine MDR1-Gen) abgelesen wird, wodurch der MDR1-Transporter nicht exprimiert werden kann. Erst durch die Zugabe von Tetrazyklin (Induktion) kommt es zu einer Konformationsänderung des TetO₂, sodass das gewünschte Gen abgelesen und das entsprechende Protein gebildet werden kann.

Zellen der gleichen Linie ohne Zugabe von Tetrazyklin (Tet) können dabei als Kontrolle verwendet werden, da in diesen Zellen weiterhin keine Expression des caninen MDR1 stattfindet.

Die entsprechenden Zelllinien standen zu Beginn dieser Arbeit bereits im Institut zur Verfügung; Isolation, Klonierung und Transfektion wurden durchgeführt von Jasmin Kranz und Charlotte Straehle.

Die Zellen wurden mit Standardmedium unter folgenden Bedingungen kultiviert:

37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit.

Bei konfluentem Wachstum wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin (0,025%) abgelöst und anschließend entweder zu Weiterkultivierung auf zwei neue Schalen aufgeteilt oder in Vorbereitung der Transportmessungen in Polylysin-beschichtete 24 *well* Zellkulturplatten ausgesät. Dazu wurden zwischen 110.000 und 180.000 Zellen (in Standardmedium) in jedes *well* pipettiert und zur Induktion der MDR1-Expression 10 µl Tetrazyklin pro *well* dazu gegeben (+Tet). Die Kontrollplatten blieben ohne Tetrazyklin (-Tet). Im Anschluss wurden die Zellen zwischen 48 und 96 h in den 24 *well* Platten bis zum Erreichen einer 80%igen Konfluenz weiter kultiviert.

Pro EMO Konzentration wurden pro Versuch 3 *wells* gemessen und der Versuch 5 Mal wiederholt.

Tab.2) Beispiel für die Belegung einer 24 *well* Platte wie im Versuch verwendet. Angegeben sind die Konzentrationen von EMO in µM

	1	2	3	4	5	6
A	0	0	0	0,5	0,5	0,5
B	1	1	1	2	2	2
C	4	4	4	6	6	6
D	8	8	8	10	10	10

2.3.2 Rhodamin123 Efflux Assay

Rhodamin123 (Rh123) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der passiv via Diffusion in die Zellen aufgenommen und durch den MDR1-Transporter aktiv wieder heraus transportiert wird. Ist kein MDR1 vorhanden (wie in den nicht Tetrazyklin-induzierten Kontrollzellen) oder ist der Transporter durch ein Substrat oder einen Inhibitor gehemmt, akkumuliert Rh123 in den

Zellen und die Fluoreszenz kann gemessen werden. Die Fluoreszenz wird also mit steigenden Konzentrationen des zu testenden MDR1-Substrats/-Inhibitors immer größer. Der MDR1 vermittelte Efflux entspricht dabei der Differenz zwischen den nicht-induzierten Kontrollzellen (-Tet) und den MDR1 exprimierenden induzierten Zellen (+Tet) bei einer bestimmten Konzentration des Substrats bzw. Inhibitors.

Zur Durchführung des Rh123 Efflux Assays wurde EMO in steigenden Konzentrationen in Standardmedium mit 1% DMSO gelöst (Hemmstoffpuffer) und in einen Teil dieser Pufferlösungen Rh123 (1µM) dazu gegeben (Substratpuffer). Während des Rh123 Efflux Assays muss darauf geachtet werden, dass alle Schritte nach Pipettieren des Substratpuffers (SP) unter Lichtausschluss stattfinden, da Rh123 unter Lichteinfluss nicht stabil ist. Des Weiteren sind sämtliche Handlungen mit besonderer Sorgfalt durchzuführen, um die Zellen nicht vorzeitig vom Boden der Zellplatten abzulösen. Dabei wurde nach einem bereits im Institut von Charlotte Straehle etablierten Protokoll wie folgt verfahren:

- Medium absaugen
- Waschen der Zellen mit 0,5 – 1 ml PBS
- 15 min bei Raumtemperatur (RT) auf Taumler
- PBS absaugen
- Vorinkubation mit 250 µl Hemmstoffpuffer (HP)
- 30 min bei RT auf Taumler

Die Vorinkubation dient dazu vor Zugabe des SP die gleiche Ausgangssituation in allen Zellen zu schaffen. Dies ist besonders wichtig bei einer geringen Affinität des Hemmstoffes zum Transporter, um anschließend eine ungestörte Aufnahme des Substrates zu gewährleisten

- HP absaugen
- Inkubation mit 250 µl SP
- 1 ½ h bei RT auf Taumler unter Aluminiumfolie
- Passive Aufnahme des Rh123 in die Zelle
- SP absaugen
- Waschen der Zellen mit PBS (4°C, 4x)
- eigentlicher Rh123 Efflux: Inkubation mit 250 µl HP;
- 1 h bei 37°C unter Aluminiumfolie

Bei einer Hemmung des Transporters durch den Hemmstoff kann kein Efflux stattfinden und das Rh123 bleibt in den Zellen; findet keine Hemmung statt wird der Farbstoff aktiv durch MDR1 aus der Zelle transportiert;

- HP absaugen
- Waschen der Zellen mit PBS (4°C, 4x) zur Beendigung des Transport

- Zelllyse mit 500 µl NaOH/SDS
über Nacht bei 37°C oder übers Wochenende bei -20°C unter Aluminiumfolie

Der gleiche Assay wurde vergleichend mit Verapamil (VER) durchgeführt (4 Wiederholungen), einer weiteren häufig in Transportstudien verwendeten Substanz, die mit MDR1 interagiert (*Pauli-Magnus et al., 2000; Polli et al., 2001; Hsiao et al., 2006*), um die Affinität von EMO zum MDR1-Transporter besser einordnen zu können. VER findet auch klinische Anwendung bei der Therapie der Hypertonie und bei tachycarden Herzrhythmusstörungen.

2.3.3 Messung von Fluoreszenz und Proteingehalt

Zur Bestimmung von Fluoreszenz und Proteingehalt wurde eine photometrische Messung im Glomax-Multi+ (Promega) durchgeführt. Beide Werte wurden in einer 3-fach-Bestimmung in 96 well Platten durchgeführt und der jeweilige Mittelwert gebildet.

Als Null-Wert (Blank) diente der verwendete Lysepuffer (NaOH/SDS)

Messung der Fluoreszenz

Zur Messung der Fluoreszenz wurden 100 µl Zelllysats pro well des Zelllysats in schwarze 96 well Platten pipettiert und im Glomax bei folgenden Einstellungen gemessen:

- Anregung der Zellen bei einer Wellenlänge von 490 nm
- Detektion der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 510-570 nm

Die im jeweiligen Versuch verwendeten Puffer wurden ebenfalls mit gemessen, um eventuelle Pipettierfehler aufdecken und korrigieren zu können.

Die Korrektur der Fluoreszenzwerte erfolgte dabei nach folgender Formel:

$$x = \frac{100}{(\text{Puffer (1 bis n): Mittelwert Puffer)}) * 100}$$

Dabei entspricht x dem Faktor, mit dem der jeweilige Fluoreszenzwert multipliziert werden muss, um Schwankungen der Fluoreszenz in den verwendeten Puffern auszugleichen.

Messung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes dient der Relativierung der absoluten Fluoreszenz auf die Fluoreszenz/ μg Protein (relative Fluoreszenz). Da ein niedriger Proteingehalt mit einem niedrigen Gehalt an MDR1 korreliert, ist der Bezug der Fluoreszenz auf den Proteingehalt der Zellen ein aussagekräftigerer Wert als die absolute Fluoreszenz. Würde bei einem niedrigen Proteingehalt lediglich die absolute Fluoreszenz angegeben, könnte man hinter dem niedrigen Wert einen vermehrten Transport der Testsubstanz vermuten und so fälschlicher Weise von einer schwächeren Hemmung des MDR1-Transporters ausgehen. Die relative Fluoreszenz stellt diese Hemmung unabhängig vom Proteingehalt der Zellen dar. Im Glomax kann lediglich die Extinktion der Strahlung und nicht der Proteingehalt der Zellen direkt gemessen werden. Aus diesem Grund ist es notwendig einen Proteinstandard mit definiertem Proteingehalt mitzumessen, um aus den gemessenen Extinktionswerten der im Versuch verwendeten Zellen auf den entsprechenden Proteingehalt schließen zu können. Die Proteinkonzentrationen dieser aus bovinem Serumalbumin (BSA) hergestellten Standardreihe betrugen: 0 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$.

Zur Messung des Proteingehalts (bzw. der Extinktion) wurde nach dem Protokoll von Lowry (*Lowry et al., 1951*) verfahren. Dabei reagieren die vorhandenen Proteine zunächst mit Kupfer-Ionen (enthalten in Lösung C). Im zweiten Schritt wird Folin dazu gegeben, was zu einer Blauverfärbung der Proteine führt, welche photometrisch gemessen werden kann. Eine intensivere Farbreaktion korreliert dabei mit einem hohen Gehalt an Proteinen. Die Durchführung erfolgte wie folgt:

- 20 μl Zelllysate/well
- Zugabe von 200 μl Lösung C
- Inkubation bei RT für 15 min
- Zugabe von 40 μl Folin
- Inkubation bei RT für 2 h
- Messung der Extinktion bei 750 nm

2.3.4 Material

2.3.4.1 Chemikalien, Reagenzien, Arzneistoffe

Substanz		Hersteller/Bezug
BSA (Cohn Fraktion V)	Bovines Serumalbumin Lysepuffer	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Roth, Karlsruhe
Emodepsid (PF1022-221, Bay 44-4400)		Bayer, Leverkusen
Folin (pro well)	10 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz 30 µl ddH ₂ O	Sigma, Taufkirchen
HEPES Puffer (1 L) (pH 7,4 mit HCl/NaOH einstellen)	HEPES (18 mM; 4,77 g) NaCl (120 mM; 7,07 g) KCl (5 mM; 0,4 g) KH ₂ PO ₄ (0,4 mM; 0,06 g) Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O (0,3 mM; 0,08g) Glucose (6 mM; 1 g) Phenolrot (0,03 mM; 0,01 g) EDTA (1 mM; 0,37 g)	Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen Roth, Karlsruhe
Lösung C (pro well)	200 µl Na ₂ CO ₃ 8 µl CuSO ₄ 8 µl K ⁺ -Na ⁺ -Tartrat	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
Lysepuffer	NaOH (4%) SDS (0,1%)	Roth, Karlsruhe Sigma, Taufkirchen
10 x PBS (1 L) pH 7,4 mit HCl einstellen autoklavieren als 1 x verwenden	NaCl (1380 mM; 80 g) KCl (27 mM; 2 g) Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O (100 mM; 26,8 g) KH ₂ PO ₄ (18 mM; 2,4 g)	Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
Poly-L-Lysin (-Hydrobromid) (100mg/ml)		Sigma, Steinheim
Rhodamin123 (1µM)		PromoKine, Heidelberg
Standardmedium (HEK293 Medium)	DMEM (high glucose) (43,5%) F12 (Ham) (43,5%) FKS (10%) L-Glutamin (2%) Penicillin-Streptomycin (1%)	Gibco (Life Technologies) Paisley, GB Gibco (Life Technologies) Paisley, GB Sigma, Steinheim PAN Biotech, Aidenbach PAN Biotech, Aidenbach
Tetrazyklin(hydrochlorid) (10 µg/ml)		Sigma, Taufkirchen
Trypsinlösung	Trypsin (0,025%) HEPES Puffer	PAA, Pasching, AT

2.3.4.2 Geräte

Gerät	Hersteller/Bezug
Brutschrank	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Inkubator	New Brunswick Scientific, Edison, USA
CO ₂ -Inkubator Nuaire US AutoFlow	Integra Biosciences, Zizers, CH
Divac 2.4L Vakuumpumpe	Leybold, Köln
Glomax Multi+	Promega, Madison, USA
Laminar Flow, Clean Air, Typ DLF-REL 6	Heraeus, Hanau
Laminar Flow, DanLAF VFR 1806	Claus Damm, Fredensborg DK
Laminar Flow, NU-437-500-E	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µl)	Gilson, Middleton, USA / Sartorius (Biohit), Rosbach
Pipettierhilfe Pipettboy Acu	Integra Biosciences, Zizers, CH
Taumler Heidolph Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Vortex VF 2	Janke und Kunkel, Staufen
Wärmeplatte	Werkstatt MZI, Gießen
Wasserbad	Memmert, Schwalbach

2.4 *In vivo* Versuche

Alle *in vivo* Versuche wurden vor Beginn der Studie beim Regierungspräsidium Gießen nach gültigem Recht (Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 21. Dezember 2006) beantragt und am 26.10.2011 genehmigt.

Geschäftszeichen bei der Behörde: V 54-19 c 20 (1) GI 18/11 Nr. 53/2011

2.4.1 Versuchstiere

Tierart	Maus
Stamm	(1) Crl:CF1-Abcb1a ^{mds} (Kurzbezeichnung: PGP-Mutant/ PGP ^{mut})
	(2) Crl:CF1 (Kurzbezeichnung: PGP-Wildtyp/PGP ^{WT})
Herkunft	Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA)
Genetik	Auszuchtstamm mit natürlicher Mutation im <i>mdr1a</i> -Gen

2.4.1.1 *Haltungsbedingungen*

Die Tiere wurden von der Firma Charles River bezogen und im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität weiter gezüchtet, solange dabei der Auszuchtcharakter des Stammes beibehalten werden konnte.

Alle Tiere wurden in Gruppen in einzeln belüfteten Käfigen unter spezifiziert Pathogen-freien (SPF) Bedingungen gehalten (Kontrolle des Hygienestatus vierteljährlich). Die Fütterung erfolgte *ad libitum* (Altromin Standard Haltungsdiät bzw. Altromin Standard Zuchtdiät). Das Lichtregime bestand aus einem 12 h hell/dunkel Rhythmus.

Mit Beginn des Trainings auf dem Rotarod (siehe 4.2.3) wurden die Tiere in einen Experimentalraum mit konventioneller Haltung verbracht; dort erfolgte keine weitere Kontrolle des Hygienestatus. Der 12 h hell/dunkel Rhythmus wurde umgedreht (Dunkelphase von 8.00 Uhr bis 20.00 Uhr, Hellphase von 20.00. bis 8.00 Uhr), um das Training und die folgenden Messungen in der Wachphase der Tiere vornehmen zu können. Sowohl das Training als auch die Versuche wurden bei Rotlicht-Beleuchtung durchgeführt, um den natürlichen Rhythmus der Tiere nicht zu stören. Allen Tieren wurde unter diesen neuen Haltungsbedingungen zunächst eine 2-wöchige Gewöhnungsphase gewährt.

2.4.1.2 *Genetik*

Mäuse verfügen – im Gegensatz zum Hund – über zwei *MDR1*-Gene: *mdr1a* und *mdr1b*. Diese Gene sind verantwortlich für die Expression des MDR1-Transporters in verschiedenen Geweben. *Mdr1a* ist vor allem im Darm und in der Lunge vorhanden, *mdr1b* besonders in

endokrinen Organen, Uterus und Placenta. Für die hier durchgeführten Versuche ist allerdings die Tatsache am wichtigsten, dass im ZNS ausschließlich *mdr1a* exprimiert wird (Schinkel et al., 1995a).

Bei den PGP^{mut} Mäusen handelt es sich um einen Auszuchtstamm mit natürlicher Mutation im *mdr1a*-Gen. Durch Insertion eines murinen Leukämie-Virus im *mdr1a*-Gen kann kein funktionsfähiger MDR1-Transporter in der Blut-Hirn-Schranke gebildet werden (Schinkel et al., 1995b; Lankas et al., 1997; Pippert und Umbenhauer, 2001; Janko und Geyer, 2012). Obwohl das verbleibende *mdr1b*-Gen weiterhin einen funktionsfähigen MDR1-Transporter in den entsprechenden Geweben bildet, entspricht die Situation bei diesem Mausmodell dennoch weitestgehend der beim Hund (fehlender MDR1-Transporter vor allem in der BHS von Bedeutung).

Gewebe	<i>mdr1a</i>	<i>mdr1b</i>
ZNS	+	-
Magen	-	+
Jejunum/Ileum	+++	+
Colon	+++	+
Leber	+	+
Nebenniere	+	++++
Ovar	+	++
Hoden	+	-
Nieren	+	++
Uterus	+	+
tragender Uterus	+	++++
Placenta	-	+++
Skelettmuskel	+	+
Herzmuskel	+	+
Lunge	++	+
Milz	+	+

Tab. 3) Gewebeverteilung der beiden *mdr1*-Isoformen der Maus; modifiziert nach Schinkel et al., 1995a

Die Mutation wurde 1995 im Zusammenhang mit ungewöhnlichen Reaktionen auf bestimmte Substanzen in den Laboren der Firma Merck (Westpoint, PA, USA) identifiziert und die betroffenen Mäuse in Zusammenarbeit mit der Firma Charles River als eigener Stamm weiter gezüchtet*. Dieser Stamm ist heute etabliert in den Forschungsbereichen Neurowissenschaften und Toxikologie.

Die PGP^{mut} Mäuse sind unter normalen Haltungsbedingungen keinen Schmerzen, Leiden oder Schäden ausgesetzt und unterscheiden sich nicht vom entsprechenden Wildtypstamm, der als Kontrolle dient.

(*Weitere Informationen unter: http://www.criver.com/files/pdfs/rms/pgp/rm_rm_d_pgp_mouse.aspx)

2.4.2 Gewebeverteilung von Emodepsid

Ziel dieses Versuchsteils war die Ermittlung eines möglichen MDR1-Genotyp-abhängigen Unterschieds in der Gewebeverteilung von EMO. Aus praktischen Gründen und im Sinne einer Reduzierung der Tierzahl, wurde die EMO Konzentration in den untersuchten Geweben nur zu einem einzigen Zeitpunkt gemessen.

Da männliche Mäuse generell schlechtere motorische Leistungen auf dem Rotarod zeigen (*McFadyen et al., 2003; Bothe et al., 2005*) wurden für diesen Versuchsteil (siehe 2.4.3) nur weibliche Tiere eingesetzt. Um die Tierzahl aber möglichst gering zu halten, wurden für die Organverteilung dann nur die entsprechenden männlichen Wurfgeschwister (Alter 25 - 27 Wochen) verwendet.

EMO wurde in einer Mischung aus 1,2 Propandiol (56%) und Glycerinformal (44%) gelöst. Dieses Lösungsmittelgemisch zeigte in früheren Versuchen keinen Einfluss auf die Tiere beider Genotypen (*Janko und Geyer, 2012*).

Allen Tieren wurde vor der Substanzgabe eine Stunde lang das Futter entzogen, um die perorale Applikation mittels Schlundsonde zu erleichtern. Nach der Applikation wurde direkt wieder Futter *ad libitum* angeboten. Wasser stand die ganze Zeit über zur freien Verfügung. Nach Sicherstellung, dass die Applikation sachgemäß durchgeführt worden war, erfolgte zwei Stunden lang keine weitere Manipulation, wobei 2 h dem Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration nach peroraler Applikation entsprechen (*EMA, 2005; Krüdwagen und Schimmel, 2011*). Anschließend erfolgte die Narkose mittels 16 mg/kg Xylazin und 120 mg/kg Ketamin (verdünnt mit physiologischer Kochsalzlösung). Nach Erreichen des Toleranzstadiums wurden die Tiere durch Herzpunktion getötet, um dabei ausreichend Blut zur Gewinnung von Plasma für die Analytik gewinnen zu können. Anschließend wurde wie folgt verfahren:

- Überführung des Blutes in ein Natrium-Citratröhrchen zur Verhinderung der Blutgerinnung
- Desinfektion des Operationsbereichs mit 70%igem Ethanol
- Eröffnung der Bauchhöhle und Entnahme von Leber und Nieren
- Eröffnung der Schädelhöhle und Entnahme des Gehirns
- Zentrifugation der Blutproben (10 min bei 2000 rpm/280 G) zur Gewinnung von Blutplasma
- Einfrieren der Proben bei – 80°C

Alle Proben wurden bis zum Einfrieren auf Eis gelagert

2.4.2.1 Analyse der Proben

Die Analyse der Proben erfolgte durch die Firma Bayer im Labor von Herrn Dr. Ralph Krebber (Monheim) mittels Flüssigkeitschromatografie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS). Bei der LC-MS/MS werden Substanzen bzw. Substanzgemische nach ihrer Masse und Ladung aufgetrennt und sortiert, so dass einzelne Bestandteile bestimmt und ihre Menge analysiert werden können.

Die Nachweisgrenze von EMO lag dabei im Gewebe bei 10 ng/g. Die Quantifizierungs- bzw. Validierungsgrenze im Gewebe lag bei 50 ng/g. Werte im Bereich zwischen Nachweisgrenze und Quantifizierungsgrenze wurden nach Rücksprache mit dem Labor in die Auswertung eingeschlossen. Die Nachweis- und Quantifizierungsgrenze für Plasma betrug 2 ng/mL.

2.4.3 Messung der Neurotoxizität von Emodepsid

2.4.3.1 Rotarod Model

Das Rotarod (Werkstatt MZI, Gießen) dient der Messung und Quantifizierung von Störungen der Motorkoordination, vor allem von Ataxie. Es handelt sich dabei um eine rotierende Walze mit einem Durchmesser von 2,5 cm, welche rückwärts rotiert, sodass die Mäuse mit dem Kopf zum Experimentator vorwärts laufen können. Durch Trennwände ist die Walze in 4 Laufplätze unterteilt, sodass bis zu 4 Tiere gleichzeitig auf dem Rotarod platziert und gemessen werden können ohne einander abzulenken. Jeder Laufplatz ist mit einer Stoppuhr kombiniert, die mit Beginn des Laufens eingeschaltet wird. Unter den Laufplätzen befinden sich Metallschalen, in denen die Tiere aufgefangen werden, wenn sie vom Rotarod herunter fallen. Der Abstand zwischen Walze und Schale ist dabei so gewählt, dass die Tiere sich beim Fallen nicht verletzen, aber auch nicht willkürlich vom Rotarod herunter klettern können. Beim Fallen wird eine Lichtschranke durchbrochen, sodass die gelaufene Zeit automatisch gestoppt wird. Die Drehgeschwindigkeit der Walze kann im Bereich 6 – 60 Umdrehungen pro Minute (= *rounds per minute*, rpm) reguliert werden. Wird eine Substanz appliziert, die neurologische Symptome induziert, kann durch die verminderte Laufleistung (siehe Bewertungsschema unter 2.4.3.2), die Dauer und der Grad der Ataxie dargestellt werden. Dazu wurde die Laufleistung in verschiedenen Abständen jeweils 3x gemessen und aus den gewonnenen Werten eine Laufkurve erstellt. Zum Vergleich einzelner Tiere oder zwischen verschiedenen Gruppen, können die entsprechenden Flächen über diesen Laufkurven berechnet und einander gegenüber gestellt werden.

Das Rotarod wird bereits lange und häufig in den Forschungsbereichen Motorkoordination und motorisches Lernen sowie zur allgemeinen Phänotypisierung eingesetzt (Carter *et al.*, 2001; Brooks und Dunnett, 2009).

2.4.3.2 Rotarod Versuchsaufbau

Verwendet wurden weibliche PGP^{mut} und PGP^{WT} Mäuse, die in einem Alter von mindestens 6 Wochen mit dem Rotarod Training begannen. Die eingestellte Geschwindigkeit betrug 16 rpm. Alle Tiere wurden solange trainiert bis sie mindestens 1 Woche lang problemlos 2 min durchlaufen konnten. Diese Einstellungen des Rotarod gehen auf Dawson zurück (*Dawson et al., 2000*). Anschließend wurde EMO in der Konzentration 1 mg/kg wie im Versuchsteil „Gewebeverteilung“ (2.4.2) beschrieben gelöst und appliziert. Um die perorale Applikation mittels Schlundsonde zu erleichtern wurde den Tieren auch in diesem Versuchsteil eine Stunde lang das Futter entzogen. Nach der Applikation hatten alle Tiere wieder freien Zugang zu Futter. Die Laufperformance auf dem Rotarod wurde im Anschluss alle 2 h an Tag 1, alle 4 h an Tag 2 und alle 6 h an allen folgenden Tagen jeweils 3x gemessen, bis die Tiere ihre Trainingsleistung wieder erreicht hatten. Gleichzeitig wurden beobachtete klinische Symptome beschrieben und dokumentiert. In den Ruhephasen der Tiere fanden keine Messungen statt. Die Bewertung der Laufleistung erfolgte nach folgendem von Christina Janko am Institut etablierten Schema:

Tab.4) Bewertungsschema des verwendeten Rotarod-Setups

Zeit	Punkte
≥ 2 min ohne Einschränkungen	5
1 – 2 min ohne Einschränkungen	4
1 – 2 min mit Einschränkungen*	3
30 sec – 1 min	2
1 sec – 30 sec	1
0 sec	0

(* z.B. an der Wand abstützen, schwankend, flach auf die Walze gepresst, ausgleiten ohne zu Fallen)

Die Umrechnung der Laufdauer in Punkte ermöglicht die Unterscheidung der Laufleistung mit oder ohne Einschränkungen und damit eine differenziertere Darstellung der Laufperformance. Dies kann vor allem bei geringgradigen Intoxikationen von Vorteil sein, da in diesen Fällen oftmals das 2-minütige Laufen auf dem Rotarod zwar möglich ist, allerdings mit Unsicherheit einhergeht. Die alleinige Angabe der Laufzeiten wäre in diesen Fällen zur Darstellung der neurologischen Symptomatik weniger aussagekräftig.

Um allen Tieren die Möglichkeit zu geben sich vollständig und ungestört von der Applikation zu erholen, wurden bis zur ersten Messung nach 2 h keinerlei Beobachtungen oder Handling durchgeführt. Möglicherweise bereits in dieser Zeit aufgetretene Symptome wurden daher nicht dokumentiert.

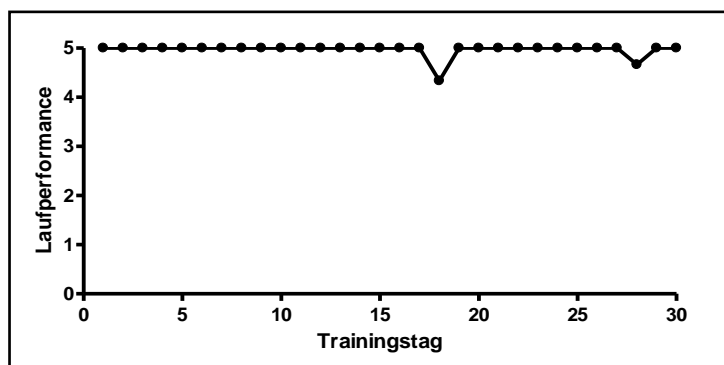


Abb.3) Beispiel für die Laufperformance einer Maus im Training, das heißt ohne Applikation von neurotoxischen Substanzen

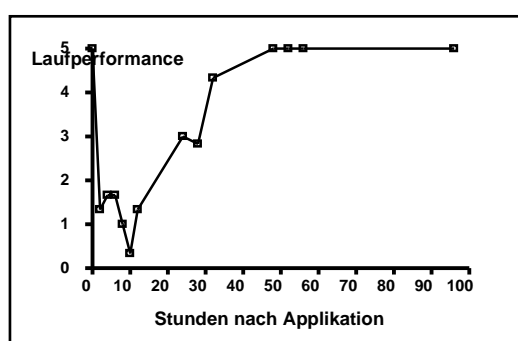


Abb.4) Beispiel für die Laufperformance einer Maus nach Applikation einer neurotoxischen Substanz

2.4.4 Materialien

2.4.4.1 Chemikalien, Reagenzien, Arzneistoffe

Substanz	Hersteller/Bezug
1,2 Propandiol	Sigma, Steinheim
Emodepsid (Bay 44-4400)	Bayer, Leverkusen
Glycerinformal	Fluka, Seelze
Ketamin (10%)	CP-Pharma, Burgdorf
NaCl	B. Braun, Melsungen
Xylazin (2%)	CEVA, Düsseldorf

2.4.4.2 Geräte

Gerät	Hersteller/Bezug
Operationsbesteck	diverse
Rotarod	Werkstatt MZI, Gießen
Schlundsonde	diverse
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg

2.5 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller/Bezug
12,5 cm ² Kulturschalen	BD Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
24 well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
25 cm ² Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
75 cm ² Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
96 well Mikrotiterplatten, schwarz	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96 well Mikrotiterplatten, weiß	Sarstedt, Nümbrecht
CryoPure Gefäße, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Einmalspritzen	B. Braun, Melsungen
Einwegkanülen	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Natriumcitratröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrilhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten, Glas	MAGV, Rabenau
Pasteurpipetten, Plastik	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Reaktionsgefäße (1,5, 2, 15, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Einmalpipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Stickstoff, flüssig	Messer, Griesheim
Trypanblau (4%)	Fluka, Seelze

2.6 Auswertung

Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung. Da aufgrund der geringen n-Zahl und der großen Schwankungen der Daten keine Normalverteilung vorausgesetzt werden kann, erfolgte die Analyse der Daten sofern nicht anders angegeben rein deskriptiv.

2.6.1 Graph Pad Prism

Programm zur graphischen und statistischen Auswertung von Daten, sowie zur Berechnung und Darstellung von Kinetiken.

Version: Graph Pad Prism 4 (San Diego, CA, USA); www.graphpad.com/prism/pdemo.htm

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie gemeldeten Fälle von Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® beim Hund

Die 55 hier beschriebenen Fälle von Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von EMO bzw. Profender® Tabletten für den Hund wurden dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie in einem Zeitraum von rund 4 Jahren gemeldet (Juni 2009 bis Mai 2013)

Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass es nicht in allen Fällen gelungen ist, den kompletten Verlauf dieser Arzneimittelunverträglichkeiten vollständig zu rekonstruieren.

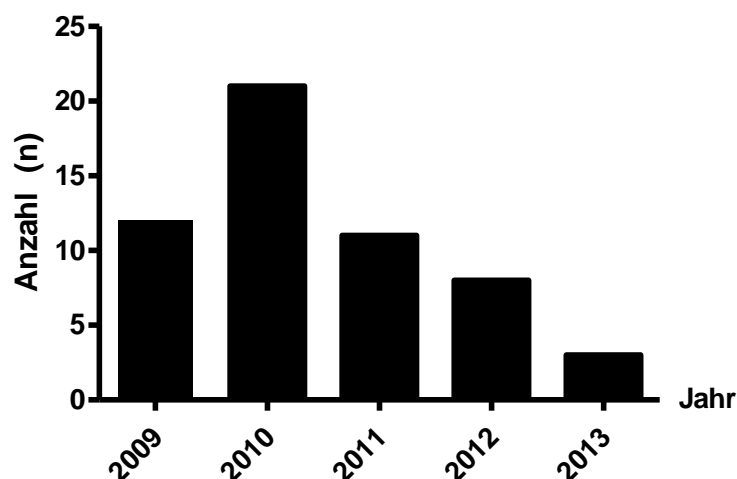


Abb.5) Dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen gemeldete Fälle von Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® beim Hund (Stand: Mai 2013).

3.1.1 Symptome

Die beschriebene Symptomatik war vielfältig. Vor allem Ataxie, Salivation und Störungen der Muskelkoordination wurden sehr häufig beobachtet. Letztere wurden unterschiedlich beschrieben, meist als Zittern oder Zuckungen, teilweise aber auch als Krämpfe.

Auch vermehrtes Hecheln, Hyperthermie, Tachykardie, Nervosität und Unruhe bis zur Schlaflosigkeit wurden häufig angegeben.

Andere Symptome traten ebenfalls auf, allerdings weniger oft oder nur vereinzelt und beinhalteten unter anderem Lähmungserscheinungen, Depression/Apathie, gestörten Visus (u.a. Mydriasis und Nystagmus), Erbrechen, Durchfall und Orientierungslosigkeit. In aller

Regel traten mehrere Symptome parallel auf oder folgten aufeinander. Beispielsweise wurden die häufigsten Symptome – Ataxie, Salivation, Zittern/Zuckungen/Krämpfe – sehr oft gemeinsam beobachtet. Dabei wurde teilweise für die gleichen Tiere eine gegenteilige Symptomatik angegeben, z.B. Nervosität und Apathie².

Tab. 5) Auflistung der am häufigsten genannten Symptome der Arzneimittelunverträglichkeiten in Zusammenhang mit der Anwendung von Profender® beim Hund; da für nahezu alle Hunde mehrere Symptome genannt wurden, überschreitet die Gesamtprozentzahl 100%.

Symptom	Häufigkeit (%)
Zittern	70,9
Ataxie	61,8
Salivation	49,1
Hecheln	47,3
Krämpfe	40
Nervosität	34,5
Zuckungen	25,5
Hyperthermie	25,5
Tachykardie	21,8
Apathie	18,2
Gestörter Visus	16,4

Beginn, Grad und Dauer der Vergiftungserscheinungen variierten stark. In manchen Fällen zeigten sich erste Symptome direkt im Anschluss an die Tablettengabe. In anderen Fällen begann die Symptomatik mit bis zu 6 h Zeitverzögerung.

² Auflistung aller genannten Symptome der Arzneimittelunverträglichkeiten nach Anwendung von Profender® beim Hund ohne jegliche Wertungen: Zittern, Salivation, Ataxie, Hecheln, Krämpfe, Nervosität/Unruhe/Aufregung/ Schlaflosigkeit, Zuckungen, Hyperthermie, Apathie/Lustlosigkeit/Somnolenz/ Depression/Trägheit, Mydriasis/gestörter Visus/Nystagmus/starre Pupillen/gestörte Wahrnehmung, Tachykardie, Seitenlage/nicht stehfähig/Lähmungserscheinungen, gekrümmter Rücken/Ophistotonus/steife Gliedmaßen, Erbrechen/Würgen, Diarrhoe/Kotabsatz/Urinansatz, nicht ansprechbar, Hypoglycämie, gerötete Schleimhäute, Vokalisation, Hypertonie, Inappetenz, verhärtetes Abdomen, erhöhte Kreatinkinase-Werte, Orientierungslosigkeit, Hämaturie, blutige Diarrhoe, blasse Konjunktiven, verzögerte kapilläre Rückfüllzeit, telogenes Effluvium.

Die Dauer der Symptome schwankte zwischen 2 h und mehreren Tagen, in den meisten Fällen wurde eine Dauer von etwa 4 bis 12 h beschrieben. Der Grad der Vergiftungssymptomatik wurde dabei teils als mild, teilweise aber auch als hochgradig beschrieben.

3.1.2 Rasseverteilung

Die Rassen Collie (43,6%), Australien Shepherd (inkl. 1 Miniatur Australien Shepherd) (25,5%) und Shetland Sheepdog/Sheltie (16,4%) bildeten in den hier ausgewerteten Fällen den Großteil der betroffenen Rassen. Auch Mischlinge mit Beteiligung dieser Rassen waren vertreten (3,6%). Andere Rassen traten nur vereinzelt in Erscheinung (insgesamt 10,9%).

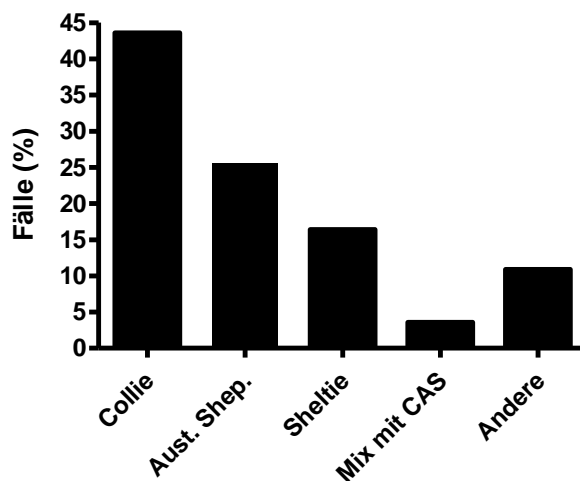


Abb.6) Rasseverteilung der Hunde mit Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® in Prozent; CAS = Collie, Australian Shepherd, Sheltie.

3.1.3 MDR1-Genotypverteilung

Es fiel auf, dass vor allen Dingen MDR1^{-/-} Hunde von Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® betroffen waren (80%). Für einige Tiere wurde allerdings auch der Genotyp MDR1^{+/+} nachgewiesen (5,5%), während für manche Tiere der Genotyp nicht bestimmt wurde und daher auch nicht bekannt war (14,5%).

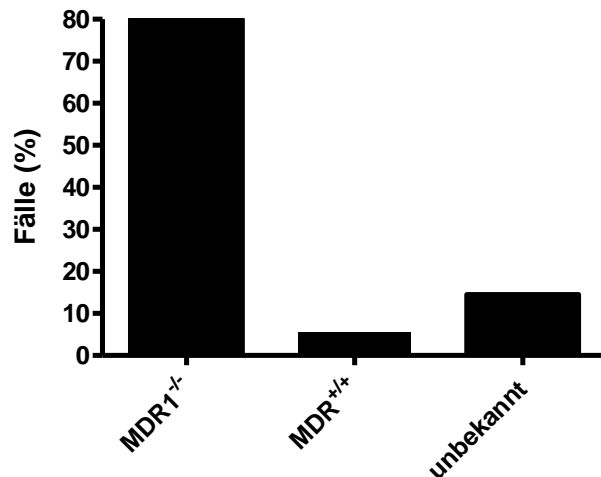


Abb.7) MDR1-Genotypverteilung der Hunde mit Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® beim Hund in Prozent.

3.1.4 Fütterungszustand und Dosierung

Bei den hier ausgewerteten Fällen konnte kein konkreter Zusammenhang zwischen dem aktuellen Fütterungszustand der betroffenen Tiere und dem Auftreten von Arzneimittelunverträglichkeiten festgestellt werden. Allerdings waren die Angaben zur Fütterung in vielen Fällen unvollständig. Häufig wurden keine Angaben gemacht oder der genaue Zeitpunkt der letzten Futteraufnahme war unbekannt bzw. konnte nicht exakt eingegrenzt werden.

Profender® Tabletten für den Hund werden nach einer Dosierungstabelle entsprechend bestimmter Gewichtsklassen dosiert. Die empfohlene Mindest-Dosis dabei ist 1 mg/kg EMO (und 5 mg/kg PZQ). Je nach Gewicht des Tieres (oberer oder unterer Bereich eines Gewichtsintervalls) schwanken die Dosierungen zwischen 1 – 1,9 mg/kg EMO (und 5 – 9,5 mg/kg PZQ). Soweit bekannt lag die Dosierung nur in 3 Fällen über diesem Dosisbereich bei 2 bzw. 2,7 mg/kg EMO und 10 bzw. 13,5 mg/kg PZQ. Als gut verträglich für Collies mit homozygotem MDR1-Defekt wurde in einer präklinischen Studie die Dosierung 1,6 mg/kg EMO und 8 mg/kg PZQ bestimmt (EMEA, 2005).

Es konnte kein deutlicher Zusammenhang zwischen Dosierung und Schweregrad und/oder Dauer der Symptome festgestellt werden. Es gab sowohl Tiere mit vergleichsweise niedriger Dosierung und relativ schwerem Verlauf als auch Tiere mit vergleichsweise hoher Dosierung und relativ mildem Verlauf.

Auch die Kombination aus zeitnaher Fütterung und vergleichsweise hoher Dosierung verschlimmerte den klinischen Verlauf nicht zwangsläufig.

3.1.5 Geschlecht

Die Mehrzahl der betroffenen Hunde war männlich (52,7% im Vergleich zu 38,2% weiblichen Tieren). In 5 Fällen (9,1%) wurden keine Angaben zum Geschlecht gemacht. Bislang gibt es keine Hinweise über einen Zusammenhang zwischen Geschlecht und dem Auftreten von Arzneimittelunverträglichkeiten mit neurologischen Symptomen nach der Anwendung von EMO bzw. Profender® (EMA, 2005).

3.2 In Vitro Transport von Emodepsid

Bereits vor Beginn dieser Studie war bekannt, dass es sich bei EMO um ein Substrat des MDR1-Transporters handelt (EMA, 2005; EMA, 2008). Allerdings wurden hierzu keine Primärdaten publiziert. Daher sollte die Interaktion von EMO mit dem caninen MDR1 (cMDR1) in den hier beschriebenen Experimenten näher untersucht werden.

3.2.1 Funktionsfähigkeit des gewählten Modells

Die Induktion der MDR1-Expression durch Tetrazyklin (Tet) im gewählten Zellmodell bewirkte eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz in den induzierten (+Tet) Zellen im Vergleich zu den nicht-induzierten (-Tet) Kontrollzellen. Eine verminderte Fluoreszenz lässt sich auf einen vermehrten Efflux von Rh123 aus den Zellen durch MDR1 zurückführen. Der cMDR1-Transporter wurde demnach ausreichend in den Zellen exprimiert und war auch funktionsfähig. Die gemessenen Fluoreszenzwerte schwankten allerdings zwischen den einzelnen Experimenten, sodass kein Referenzwert für die Abnahme der Fluoreszenz durch den Efflux von Rh123 durch MDR1 bestimmt werden konnte. Die Fluoreszenz in den +Tet Zellen war dabei in etwa zwischen 2-fach und 5-fach niedriger und erreichte nicht immer Signifikanzniveau.

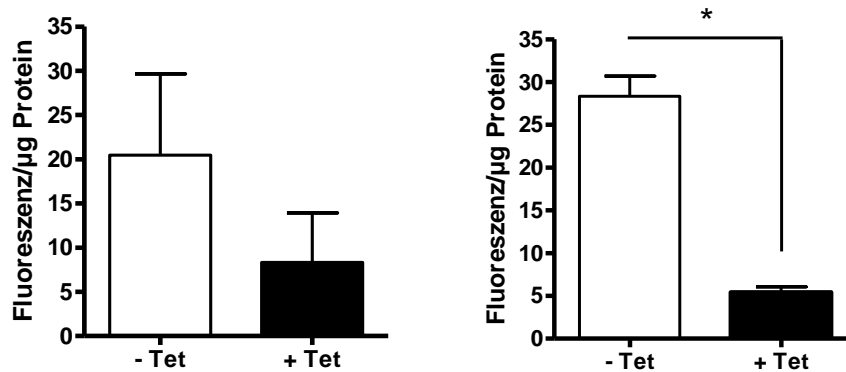


Abb.8) Vergleich der Fluoreszenz zwischen nicht-induzierten (-Tet) und induzierten (+Tet) Zellen in zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils $n = 3$. Die Ausgangswerte schwanken zwischen den einzelnen Experimenten. Die geringere Fluoreszenz in den +Tet Zellen ist auf den MDR1-vermittelten Efflux von Rh123 aus den Zellen zurück zu führen; * signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen; Student's- t -test, $p < 0,05$.

3.2.2 Interaktion von Emodepsid mit dem caninen MDR1-Transporter

Eine Interaktion von EMO mit dem MDR1-Transporter des Hundes konnte in den hier durchgeführten *in vitro* Transportstudien nachgewiesen werden.

Diese zeigte sich in einer dosisabhängigen Hemmung des Rh123-Transports und damit in einer Zunahme der Fluoreszenz in den +Tet Zellen. Die Fluoreszenzwerte stiegen bis auf das Niveau der -Tet Kontrollzellen an. Die Fluoreszenz in den nicht-induzierten Kontrollzellen ohne Hemmstoff lag dabei in mehreren unabhängigen Experimenten zwischen der durch 2 µM und der durch 4 µM EMO induzierten Hemmung des cMDR1-Transporters.

Allerdings stiegen die Fluoreszenzwerte auch in den nicht-induzierten Kontrollzellen ebenfalls mit steigender EMO-Konzentration leicht an. Dennoch gleichen sich die Fluoreszenzwerte zwischen -Tet und +Tet Zellen mit steigenden Konzentrationen EMO einander an, was die Hemmung des Rh123-Effluxes aus den Zellen durch den MDR1-Transporter belegt.

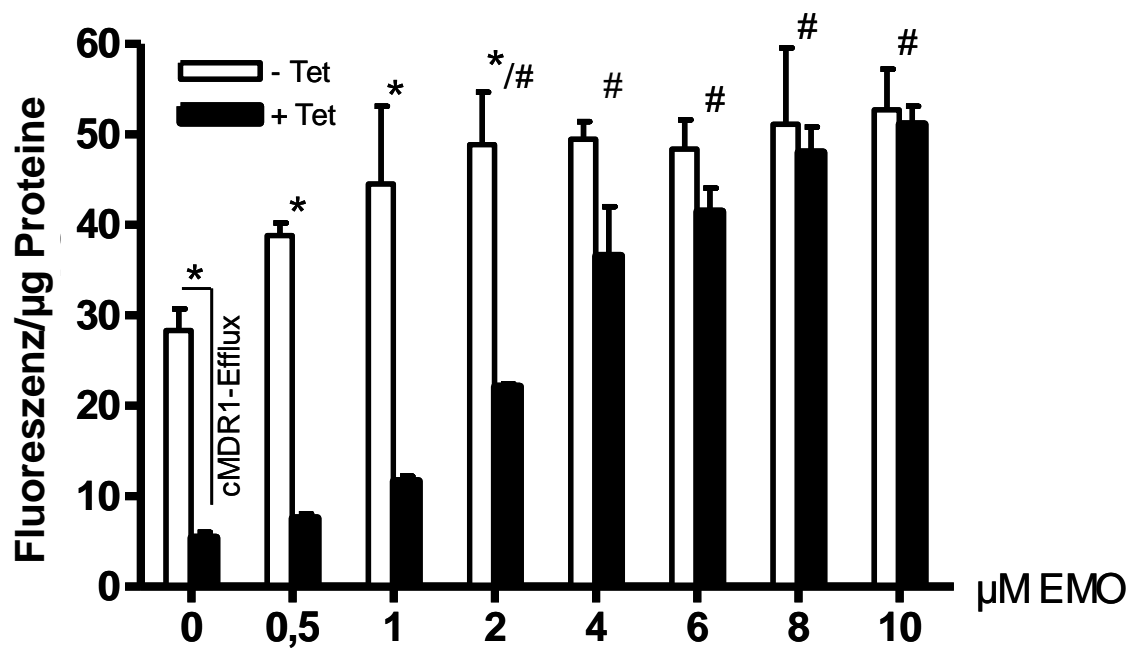


Abb.9) Ein repräsentativer Rh123-Assay mit steigenden Konzentrationen EMO (n=3). Dargestellt ist die Fluoreszenz/µg Protein vergleichend in MDR1-exprimierenden Zellen (+Tet) und Kontrollzellen (-Tet). Sowohl die Induktion der MDR1-Expression durch Tet als auch die EMO Konzentration haben einen signifikanten Einfluss auf das Fluoreszenzlevel. Die Auswertung wurde mittels zweifaktorieller ANOVA mit Post-Test (*multiple comparison adjustment*, Signifikanzniveau: $p = 0,05/15 = 0,003$) durchgeführt; * signifikanter Unterschied zwischen +Tet und -Tet bei der angegebenen EMO-Konzentration und # signifikanter Unterschied zur Konzentration 0 µM in den +Tet Zellen

Der Verlauf des Fluoreszenzanstiegs in den + Tet Zellen bis auf das Niveau der Kontrollzellen konnte dabei in allen unabhängigen Experimenten erfolgreich reproduziert werden. Allerdings schwankten die gemessenen Fluoreszenzlevel zwischen den einzelnen Versuchen, sodass in dieser Arbeit lediglich ein repräsentativer Rh123 Assay dargestellt ist und auf eine Gesamtauswertung verzichtet wurde.

3.2.3 Vergleich mit Verapamil

Auch im Falle von VER konnte die bereits bekannte Interaktion der Substanz mit dem MDR1-Transporter bestätigt werden. Eine vollständige Hemmung des caninen MDR1, gleichbedeutend mit einem Angleichen des Fluoreszenzniveaus zwischen den -Tet und den +Tet Zellen, wurde für VER erst bei 15 µM erreicht. Im Falle von EMO konnte bereits bei 6 µM kein Unterschied mehr festgestellt werden, was auf eine potentere Hemmung von cMDR1 durch EMO im Vergleich zu VER hindeutet.

Wie bereits für EMO, zeigten die -Tet Kontrollzellen auch für VER einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz über den gesamten Konzentrationsbereich.

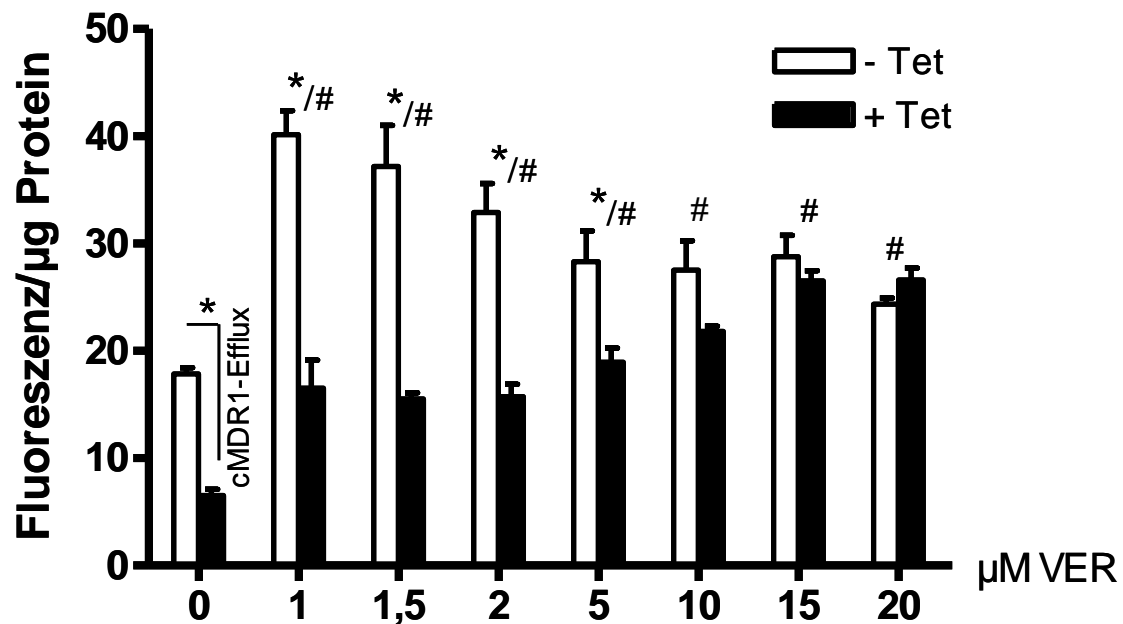


Abb.10) Ein repräsentativer Rh123-Assay mit steigenden Konzentrationen VER (n=3). Dargestellt ist die Fluoreszenz/µg Protein vergleichenden in MDR1-exprimierenden (+Tet) Zellen und Kontrollzellen (-Tet). Sowohl die Induktion der MDR1-Expression durch Tet als auch die VER Konzentration haben einen signifikanten Einfluss auf das Fluoreszenzlevel. Die Auswertung wurde mittels zweifaktorieller ANOVA mit Post-Test (*multiple comparison adjustment*, Signifikanzniveau: $p = 0,05/15 = 0,003$) durchgeführt; * signifikanter Unterschied zwischen +Tet und -Tet bei der angegebenen VER-Konzentration und # signifikanter Unterschied zur Konzentration 0 µM in den +Tet Zellen

3.3 Gewebeverteilung von Emodepsid

Nach oraler Applikation von 1 mg/kg EMO an PGP^{mut} und PGP^{WT} Mäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Arzneistoffkonzentrationen in Plasma, Leber und Nieren. Allerdings war ein sehr deutlicher Unterschied in der Gehirnkonzentration darstellbar. Während EMO im Gehirn der WT-Tiere nicht nachweisbar war, war die Konzentration in der Gruppe der PGP^{mut} Mäuse mit durchschnittlich 43,72 ng/g etwa doppelt so hoch wie die Plasmakonzentration.

Es muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass die Quantifizierungsgrenze (Validierungsgrenze) im Gewebe bei 50 ng/g lag und die meisten Werte der Gehirnkonzentration auch bei den PGP^{mut} Mäusen im Bereich zwischen der Nachweis- und der Quantifizierungsgrenze lagen. Werte in diesem Bereich beinhalten einen gewissen Grad der Unsicherheit. Daher erfolgte für die Gehirnkonzentrationen lediglich eine deskriptive Darstellung. Da allerdings alle Werte der Gehirnkonzentration im Fall der PGP^{WT} Tiere unter

der Nachweisgrenze von 10 ng/g lagen, kann dennoch von einer bedeutenden Rolle von MDR1 bei der Limitierung der Gehirnpenetration von EMO ausgegangen werden. Geht man davon aus, dass die Werte der EMO Gehirnkonzentration in den PGP^{WT} Tieren maximal 10 ng/g beträgt und der durchschnittlich gemessene Wert in den PGP^{mut} Mäusen bei 43,72 ng/g lag, kann eine mindestens 4-fach höhere Gehirnpenetration von EMO in MDR1-defekten Mäusen vermutet werden.

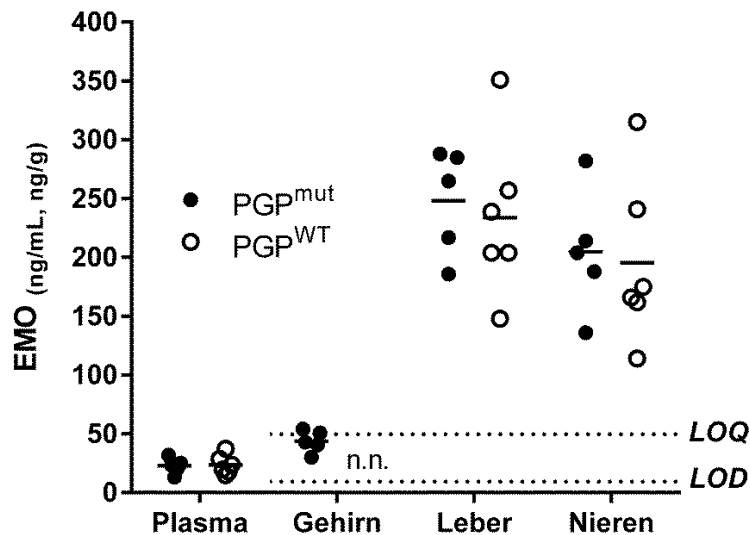


Abb.11) EMO-Konzentrationen in Plasma, Gehirn, Leber und Nieren nach der peroralen Applikation von 1 mg/kg vergleichend zwischen PGP^{mut} (n=5) und PGP^{WT} (n=6) Mäusen. LOD = *limit of detection*; LOQ = *limit of quantification*; n.n. = nicht nachweisbar.

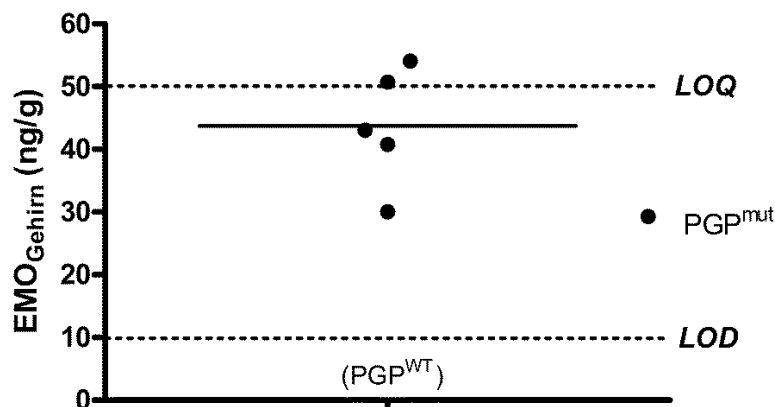


Abb.12) Genauere Darstellung der Gehirnkonzentrationen von EMO in 5 PGP^{mut} (und 6 PGP^{WT}) Mäusen nach der peroralen Applikation von 1 mg/kg. LOD = *limit of detection*; LOQ = *limit of quantification*.

Tab.6) Durchschnittliche EMO-Konzentrationen in Plasma, Gehirn, Leber und Nieren nach peroraler Applikation von 1 mg/kg vergleichend zwischen PGP^{mut} (n = 5) und PGP^{WT} (n = 6) Mäusen. Die Werte sind angegeben als Mittelwert mit Standardabweichung. LOD_(Gewebe) = *limit of detection* = 10 ng/g; LOQ_(Gewebe) = *limit of quantification* = 50 ng/g Gewebe. LOD/LOQ_(Plasma) = 2 ng/mL.

	PGP ^{mut}	PGP ^{WT}	Ratio mut/WT
Plasma	22,98 ± 6,78	23,72 ± 7,49	0,97
Gehirn	43,72 ± 8,41	< LOD	-
Leber	248,2 ± 40,16	233,83 ± 62,5	1,06
Nieren	204,8 ± 47,03	195,5 ± 65,07	1,05

	PGP ^{mut}	PGP ^{WT}
Gehirn	43,72 ± 9,4	< LOD
Plasma	22,98 ± 6,78	23,72 ± 8,21
Quotient (Gehirn/Plasma)	1,9	

Tab. 7) Verhältnis der gemessenen EMO-Konzentration in Plasma und Gehirn vergleichend in PGP^{mut} (n=5) und PGP^{WT} (n=6) Mäusen.

In der Gruppe der PGP^{mut} Mäuse zeigte sich bei einem Tier während der Organentnahme eine starke Obstipation des Darms, sodass dieses Tier aus der Auswertung ausgeschlossen wurde. Die gemessenen EMO Konzentrationen in allen Geweben lagen in diesem Fall deutlich unter denen der anderen Mäuse der Gruppe, was auf eine verminderte Absorption schließen lässt. Entsprechend wurden nur 5 PGP^{mut} und 6 PGP^{WT} bewertet.

3.4 Neurotoxizität von Emodepsid

Trotz starker Schwankungen bezüglich der Dauer der Vergiftungserscheinungen innerhalb der PGP^{mut} Gruppe zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem MDR1-Status der Tiere und dem Auftreten klinischer Symptome nach der peroralen Applikation von 1 mg/kg EMO.

3.4.1 PGP^{mut} Mäuse

Alle Tiere der Gruppe PGP^{mut} wiesen nach der Applikation von EMO einen massiven Einbruch in der Laufleistung auf dem Rotarod auf. Dabei unterschieden sich der Schweregrad und vor allem die Dauer der Symptomatik deutlich zwischen den einzelnen Tieren. Die Hälfte der Tiere zeigte sich besonders empfindlich auf EMO mit einer Vergiftungsdauer von bis zu 80 h. Die anderen Tiere erholten sich relativ schnell und waren bereits nach etwa 24 h wieder vollständig symptomfrei.

3.4.1.1 Beobachtete Symptome

Es wurden folgende Symptome nach der peroralen Applikation von 1 mg/kg EMO bei PGP^{mut} Mäusen beobachtet:

Ataxie

Hyperkinesie

- langsame Kopfbewegungen von links nach rechts mit schnellem Wechsel der Richtung, teilweise mit Beteiligung des gesamten Vorderkörpers; in einigen Fällen auch nickende Kopfbewegungen, vor allem auf dem Rotarod
- vermehrtes Aufstellen auf die Hintergliedmaßen
- vermehrtes Laufen im Käfig, vor allem von Ecke zu Ecke, teilweise auch im Kreis

Verändertes Verhalten (im späteren Verlauf, länger anhaltend als die motorische Symptomatik)

- Aufregung
- Schreckhaftigkeit/Ängstlichkeit (vor allem bei Berührung, teilweise mit Vokalisation. Die Lautäußerungen traten ohne Anzeichen von Schmerzen wie beispielsweise eingefallene Augen oder eine unphysiologische Körperhaltung auf)

Viele der beobachteten Symptome (wie beispielsweise das Aufstellen auf die Hintergliedmaßen) stellen keine für Mäuse untypische Verhaltensweise dar, die Frequenz des jeweiligen Verhaltens war allerdings nach den subjektiven Einschätzungen des Experimentators deutlich gesteigert. Da der Experimentator die Tiere auch vor und nach den Versuchen täglich kontrollierte, fiel dieser Unterschied in der Versuchsphase deutlich auf.

Da diese spezifischen Verhaltensänderungen während der Planung dieser Arbeit nicht vorhergesehen werden konnten, konnten diese bei der Durchführung der Experimente auf dem Rotarod auch nicht spezifisch bestimmt werden. Die Beschreibung ist daher rein subjektiv.

3.4.2 PGP^{WT} Mäuse

In der Gruppe der PGP^{WT} Mäuse traten weder eine verminderte Laufleistung auf dem Rotarod noch andere klinische Symptome oder Verhaltensänderungen auf. Eine geringgradige Verschlechterung der Laufleistung von 5 auf 4 Punkte lässt sich ohne das zusätzliche Auftreten von Vergiftungserscheinungen wie beispielsweise Ataxie nicht auf die applizierte Substanz zurückführen. Ein solcher Abfall der Laufperformance tritt gelegentlich auch im Training auf und kann daher vernachlässigt werden.

3.4.3 Vergleich beider Gruppen

Trotz starker Schwankungen in der Gruppe der PGP^{mut} Mäuse war ein klarer Zusammenhang zwischen MDR1-Genotyp und dem Auftreten klinischer Symptome nach der Applikation von EMO erkennbar. Dies zeigt sich vor allem beim Vergleich der Fläche über der Kurve (= *area over the curve*, AOC). Diese lag im Fall der PGP^{mut} Mäuse zwischen 12,4% und 70,9%, wohin gegen sie in der Kontrollgruppe maximal 1,8 % erreichte.

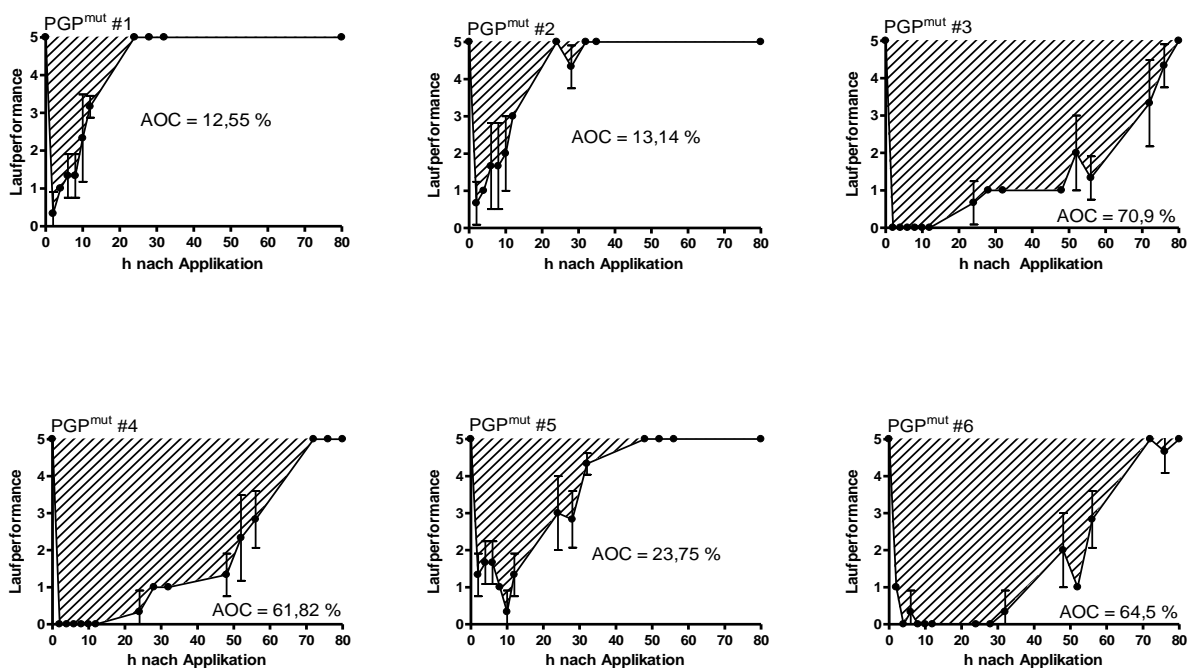


Abb.13) Laufperformance auf dem Rotarod der 6 PGP^{mut} Mäuse nach peroraler Applikation von 1 mg/kg EMO. Die Messung erfolgte alle 2 h an Tag 1, alle 4 h an Tag 2 und alle 6 h an allen folgenden Tagen. Dargestellt ist die AOC in %. Die Werte entsprechen MW und SD von n=3 Messungen zu jedem Zeitpunkt.

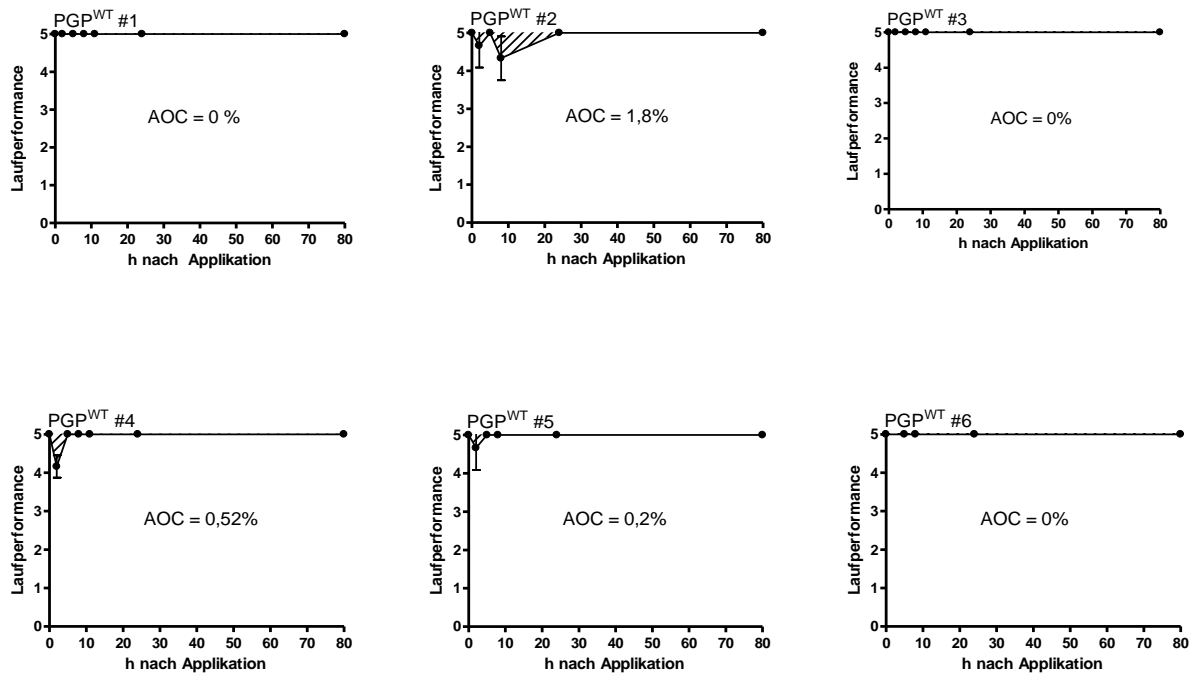


Abb.14) Laufperformance auf dem Rotarod der 6 PGP^{WT} Mäuse nach peroraler Applikation von 1 mg/kg EMO. Die Messungen erfolgten alle 2 h. Dargestellt ist die AOC in %. Die Werte entsprechen MW und SD von n=3 Messungen zu jedem Zeitpunkt.

Bei genauerer Betrachtung fiel auf, dass nicht alle PGP^{mut} Mäuse, trotz identischer Dosierung, in gleichem Ausmaß mit einem Absinken der Laufperformance auf die EMO-Applikation reagiert haben. Vielmehr zeigten sich 3 PGP^{mut} Mäuse hoch empfindlich auf EMO mit AOC-Werten von 61,82%, 64,5% und 70,9%, wohingegen 3 weitere PGP^{mut} Mäuse deutlich unempfindlicher auf EMO reagiert haben mit AOC-Werten von 12,55%, 13,14% und 23,75% (siehe Abb. 15).

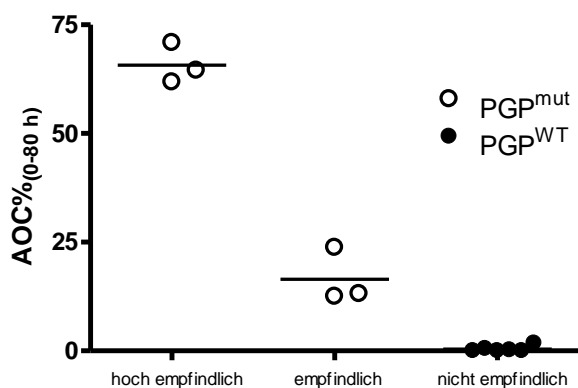


Abb.15) Verteilung der AOC%_(0-80 h) in PGP^{mut} und PGP^{WT} Mäusen nach der peroralen Applikation von 1 mg/kg EMO. Aufteilung der PGP^{mut} Gruppe in EMO empfindliche und EMO hoch empfindliche Tiere. Striche repräsentieren den jeweiligen Mittelwert.

4 Diskussion

4.1 Interaktion von Emodepsid mit dem caninen MDR1-Transporter

In der Scientific Discussion³ der europäischen Arzneimittelagentur (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA; seit 2009 European Medicines Agency, EMA) zu Profender® sowie in der Zusammenfassung der Produktcharakteristika des Präparates wird darauf hingewiesen, dass es sich bei EMO um ein Substrat des MDR1-Transporters handelt (EMEA, 2005, 2008).

Mit Hilfe des hier verwendeten Rh123 Transport Assays konnte eine Interaktion von EMO mit dem MDR1-Transporter des Hundes bestätigt werden. Allerdings kann durch dieses Modell nicht gezeigt werden, welcher Art diese Interaktion ist, da die Beeinflussung des Transporters durch die Testsubstanz lediglich indirekt durch die ansteigende Fluoreszenz gemessen wird. Dabei ist es unmöglich zu sagen, ob es sich um einen Inhibitor oder ein Substrat des MDR1-Transporters handelt und an welcher Stelle des Proteins die Bindung erfolgt.

Da EMO eine Plasmaproteinbindung von >99% aufweist (EMEA, 2011) und die Transportmessungen in FKS-haltigem Medium durchgeführt wurden, kann für die Interaktionsassays nur die Gesamtkonzentration (freies EMO plus proteingebundenes EMO) berücksichtigt werden. Dennoch ließ sich eine klar erkennbare Konzentrationsabhängigkeit im gemessenen Effekt (Fluoreszenz) darstellen.

Die Affinität von EMO zum MDR1-Transporter des Hundes scheint dabei (im hier verwendeten Model) etwas höher zu sein als die von VER, da der gleiche Anstieg der Fluoreszenz durch EMO in geringeren Konzentrationen hervorgerufen wird als durch VER (ca. 2 µM EMO im Vergleich zu ca. 5 – 10 µM VER). Allerdings können hierbei nur, wie oben beschrieben, die Gesamtkonzentrationen miteinander verglichen werden.

Der in den Kontrollzellen (-Tet) ebenfalls beobachtete Anstieg der Fluoreszenz sowohl bei EMO als auch bei VER könnte auf verschiedene Ursachen zurück zu führen sein.

³ In der Scientific Discussion werden alle Eigenschaften eines Arzneimittels dokumentiert. Sie gliedert sich auf in eine Zusammenfassung des entsprechenden Studienantrags (*summary of the dossier*), Angaben zur Prüfung von Qualität (*quality assessment*), Sicherheit (*safety assessment*) und Wirksamkeit (*efficacy assessment*) sowie einer Risiko-Nutzen-Abwägung (*benefit risk assessment*)

Eine wahrscheinliche Erklärung ist die Tatsache, dass auch die Ausgangszelllinie ohne die Transfektion mit cMDR1 eine gewisse Menge des endogenen MDR1-Transporters (human) exprimiert, welcher dann unabhängig von Tetrazyklin in allen Zellen vorhanden ist.

Diese geringen Mengen an endogenem MDR1 werden genauso wie das zusätzlich in die Zelle eingebrachte cMDR1 durch EMO oder VER gehemmt. Für diesen geringen Anteil an endogenem MDR1 reichen entsprechend niedrige Hemmstoff- Konzentrationen aus, um eine vollständige Hemmung der Transporter zu erreichen. Dies würde den geringen Anstieg der gemessenen Fluoreszenz in den nicht-induzierten Kontrollzellen (-Tet) im niedrigen Konzentrationsbereich der getesteten Substanzen (von 0 μM bis 1 μM) erklären. Bei höheren Konzentrationen scheint der endogene MDR1-Transporter dann bereits vollständig gehemmt zu sein, sodass es zu keinem weiteren Anstieg der Fluoreszenz kommt.

Die induzierten Zellen (+Tet) exprimieren große Mengen des zusätzlich eingebrachten cMDR1-Transporters. Aus diesem Grund sind bei diesen Zellen höhere Hemmstoff-Konzentrationen für eine vollständige Hemmung aller Transporter nötig, bis die gleiche Fluoreszenz wie in den Kontrollzellen erreicht wird. Die gemessene Fluoreszenz in den +Tet Zellen unterschied sich dabei ab einer Konzentration von 6 μM EMO nicht mehr signifikant von den Kontrollzellen, stieg aber bis zur Konzentration 10 μM EMO weiter kontinuierlich bis auf das gleiche Niveau der -Tet Zellen an. Im Fall von VER zeigten sich bei den Konzentrationen 15 und 20 μM keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen -Tet und +Tet Zellen.

Weiterhin besteht die Möglichkeit einer unspezifischen Stimulation der Rh123 Aufnahme in die Zellen durch niedrige Konzentrationen der Hemmstoffe. Dafür gibt es sowohl für EMO als auch für VER aber aktuell keine konkreten Hinweise.

Eine Hemmung anderer Efflux-Systeme im unteren Konzentrationsbereich, könnte ebenfalls eine Erklärung für den beobachteten Anstieg der Fluoreszenz in induzierten und nicht-induzierten Zellen sein. Auch dafür finden sich für EMO keine Anhaltspunkte in der Literatur. VER scheint ebenfalls keine weiteren bekannten Efflux-Systeme zu inhibieren (*Laupeze et al., 2001; Eisenblätter et al., 2003; Zhang et al., 2005*).

Des Weiteren kommt eine Eigenfluoreszenz der Hemmstoffe als Ursache in Frage, die bei niedrigen Konzentrationen eine Rolle spielen könnte. Dies konnte für EMO in einem Vorversuch ausgeschlossen werden und wurde auch für VER im Rahmen einer anderen Arbeit an unserem Institut widerlegt (*Charlotte Straehle, personal communication*).

In unterschiedlichen Chargen der verwendeten Zelllinie kann das Expressionslevel des MDR1-Transporters nach der Tet-Induktion leicht variieren. Die einzelnen Zellchargen unterscheiden sich auch geringfügig in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und damit auch in ihrer Konfluenz bei Beginn der Messung. Sind die Zellen sehr dicht, könnte eine gewisse Menge des Farbstoffes zwischen den Zellen haften bleiben, was die Fluoreszenz erhöht.

Dies erklärt möglicherweise auch die unterschiedlich hohen Fluoreszenzlevel zwischen den einzelnen Experimenten bei gleichem Verlauf des Fluoreszenzanstiegs. Es besteht weiterhin die Möglichkeit einer gewissen Restmenge Tetrazyklin in dem im Medium enthaltenen FKS, welches auf eine mögliche antibiotische Behandlung der Spendertiere zurückgeführt werden könnte (Mühlhardt, 2009). So ist ggf. auch in den Kontrollzellen eine geringe Menge an cMDR1 vorhanden, welche ebenfalls Rh123 aus den Zellen transportiert und in seiner Funktion durch EMO gehemmt werden kann.

Im Fall von VER nahm die Fluoreszenz in den –Tet Zellen sogar mit steigenden Konzentrationen leicht ab. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass VER in höheren Konzentrationen unter Umständen nicht mehr vollständig gelöst vorlag, obwohl im Substrat- und Hemmstoffpuffer keine Hinweise darauf erkennbar waren. Alle im Versuch verwendeten Lösungen waren klar und ohne sichtbare feste Bestandteile. Eine geringere Löslichkeit in höheren Konzentrationen könnte allerdings eine Ursache für die leichte Abnahme der Fluoreszenz in den Kontrollzellen sein.

Wie EMO ist auch VER ein Wirkstoff mit sehr hoher Plasmaproteinbindung (90%) (Forth et al, 2001). Aus diesem Grund kann auch für VER immer nur von der Gesamtkonzentration ausgegangen werden. Eine Unterscheidung in freies und proteingebundenes VER ist nicht möglich.

Obwohl keine abschließende Erklärung für den Anstieg der Fluoreszenz in den Kontrollzellen gegeben werden kann, kann dieser Effekt bei der Beantwortung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit vernachlässigt werden, da sowohl bei EMO als auch bei VER mit steigenden Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen +Tet und –Tet Zellen auftraten. Diese Annäherung der Fluoreszenzwerte zwischen MDR1-exprimierenden (+Tet) und Kontrollzellen (-Tet) belegt eine Hemmung des cMDR1-Transporters durch EMO und VER unabhängig von allen anderen beobachteten Effekten.

4.2 Einflüsse auf die Verträglichkeit von Profender® Tabletten für den Hund

4.2.1 MDR1-Genotyp, Rasse, Dosierung, Fütterungszustand, Geschlecht

Zwar ließen sich die beim Hund beschriebenen Arzneimittelunverträglichkeiten in der Regel nicht zweifelsfrei auf die Profender® Anwendung zurückführen, aufgrund der zeitlichen Übereinstimmung und der Häufung gemeldeter Fälle mit sehr ähnlichem Charakter wird im Folgenden aber von einem Zusammenhang ausgegangen.

In einem Zeitraum von etwa 4 Jahren wurden unserem Institut knapp 80 Fälle von Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® beim Hund gemeldet.

Dies waren im genannten Zeitraum sogar mehr Fälle als durch Makrozyklische Laktone verursachte Intoxikationen bei MDR1^{-/-} Hunden.

Die Tatsache, dass nur 3 Rassen fast alle gemeldeten Fälle (85,5%) ausmachen, korreliert mit dem Umstand, dass in den Rassen Collie, Australian Shepherd und Sheltie zum einen der MDR1-Defekt weit verbreitet ist und andererseits diese Rassen in Deutschland vergleichsweise beliebt sind.

Diese Rassen sind in unserer MDR1-Diagnostik sehr viel häufiger vertreten als andere Rassen. Im entsprechenden Auftragsformular wird auch gezielt nach bisher bereits aufgetretenen Arzneimittelunverträglichkeiten gefragt, sodass evtl. Fälle von Arzneimittelunverträglichkeiten nach Profender® Anwendung bei anderen Rassen nicht in gleichem Umfang an unser Institut gemeldet wurden. Daher kann eine gewisse Überrepräsentation der drei genannten Rassen nicht ausgeschlossen werden. Allerdings werden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie auch Hunde vieler anderer Rassen auf das Vorliegen der MDR1 nt230(del4) Mutation getestet. Diese waren aber in den Meldungen zu Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® tatsächlich weniger vertreten. Eine vergleichbare Rasseverteilung zeigt sich auch bei der verantwortlichen Bundesbehörde (BVL).

Die Tatsache, dass ein Großteil der betroffenen Hunde den Genotyp MDR1^{-/-} zeigt, weist auf einen Zusammenhang zwischen MDR1-Genotyp und dem Auftreten der Arzneimittelunverträglichkeiten nach Anwendung von Profender® hin.

Allerdings wiesen auch einige der betroffenen Tiere den MDR1-Genotyp MDR1^{+/+} auf und zeigten überwiegend die gleiche Symptomatik wie MDR1^{-/-} Hunde. Eine Überdosierung erfolgte dabei nicht, sodass die Gründe für die sehr ähnlichen Arzneimittelunverträglichkeiten bei den MDR1-intakten Hunden unklar bleiben.

Grundsätzlich besteht dabei die Möglichkeit einer anderen Veränderung im MDR1-Transporter, die bisher nicht bekannt ist. Die als MDR1-Defekt bekannte MDR1 nt230(del4) Mutation beschreibt lediglich eine ganz bestimmte Veränderung im entsprechenden Gen, welche bisher als einzige diagnostisch nachgewiesen werden kann. Auch Begleiterkrankungen, die zu einer erhöhten Durchlässigkeit der BHS (wie beispielsweise Meningitis) führen, sowie AS Wechselwirkungen mit anderen MDR1-Substraten kommen für eine entsprechende Symptomatik in Frage. Es kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass die Arzneimittelunverträglichkeiten auf komplett andere Ursachen zurück zu führen sind.

Bei einem der MDR^{+/+} Tiere (Dosierung unbekannt) trat z.B. blutiges Erbrechen und blutige Diarrhoe auf, wobei Erbrechen laut Besitzerangaben bereits nach früheren Profender® Anwendungen beobachtet wurde. Die ansonsten typischen Symptome wie Zittern oder Ataxie fehlten hingegen.

Der Genotyp scheint daher trotz einiger gemeldeter Fälle bei MDR1^{+/+} Hunden als einziger Parameter einen klaren Zusammenhang zum Auftreten von Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von EMO bzw. Profender® zu zeigen, obwohl EMO (in Kombination mit PZQ) auch an MDR1^{-/-} Collies bis zu einer Dosierung von 1,6 mg/kg EMO (und 8 mg/kg PZQ) als sicher getestet wurde (EMA, 2005, 2008). Die empfohlenen Dosierungen gehen bei den auf dem Markt erhältlichen Tablettengrößen allerdings bis zu einer Dosis von 1,9 mg/kg EMO.

Da es sich bei dem Präparat Profender® - Tabletten für den Hund um eine Retardformulierung handelt, empfiehlt der Zulassungsinhaber die Tablette nüchtern zu geben, da eine aktive Verdauung zur schnelleren Auflösung der Tablette und erhöhten Freisetzung der Wirkstoffe führt. Dadurch können Häufigkeit und Grad von Arzneimittelunverträglichkeiten erhöht werden.

In den hier beschriebenen Fällen ließ sich allerdings kein klarer Zusammenhang zwischen dem aktuellen Fütterungszustand des betroffenen Hundes und der Dauer oder dem Grad der beschriebenen Symptome feststellen.

Ein möglicher Grund dafür ist, dass große interindividuelle Unterschiede im pH Wert des Magens und in der Geschwindigkeit der Magendarmpassage bestehen, sodass nach gleich langer Fastenzeit bei verschiedenen Tieren unter Umständen ein unterschiedlicher Füllungsgrad des Magen-Darm-Traktes besteht. Die Freisetzung der Wirkstoffe erfolgt also vermutlich unterschiedlich schnell.

Auch die Art des Futters kann eine Rolle spielen, da sich das lipophile EMO in Gegenwart von fettreichem Futter besser löst. Auch die Komplexbildung mit Gallensäuren erhöht die Löslichkeit von EMO (Lange, 2011). Eine verbesserte Löslichkeit spiegelt sich in einer vermehrten Resorption und damit einem höheren Plasmaspiegel wider.

Die Futteraufnahme von Tieren in der tierärztlichen Praxis kann in der Regel nicht so genau kontrolliert werden wie unter Laborbedingungen.

Retard-AM werden formuliert um einerseits eine verlängerte Wirkdauer zu erzielen und andererseits hohe Peakkonzentrationen zu vermeiden. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ist dabei fast immer von der Anflutungsgeschwindigkeit abhängig und nicht von der resorbierten Gesamtmenge, die sich durch die verzögerte Freisetzung meistens nicht ändert. Im schlimmsten Fall wird der gesamte Wirkstoff auf einmal aus der Retardformulierung frei gesetzt, was als Dose-Dumping bezeichnet wird (Derendorf et al., 2011).

In den hier ausgewerteten Fällen war die Mehrheit der Tiere männlich. Da es im EMA-Report keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Geschlecht und dem Auftreten akuter Arzneimittelunverträglichkeiten gibt, handelt es sich dabei vermutlich um einen Zufall. Lediglich bei wiederholter Anwendung über einen längeren Zeitraum (täglich über 4 Wochen)

zeigten sich in klinischen Studien geringe Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Hunden. Bei hoher Dosierung (20 mg/kg) war die Futteraufnahme bei weiblichen Tieren teilweise reduziert, was bei männlichen Tieren nicht zu beobachten war. Auch die Gewichtszunahme war bei Hündinnen bereits in niedrigerer Dosierung (≥ 10 mg/kg) als beim Rüden (20 mg/kg) leicht reduziert. In der folgenden Erholungsphase („*recovery period*“) waren allerdings keine Unterschiede in der Gewichtszunahme bei hoch dosierten Tieren beider Geschlechter erkennbar.

Bei hohen Dosierungen traten in beiden Gruppen unerwünschte Effekte auf. Bei männlichen Tieren wurde vermehrt Erbrechen sowie Tremor und Ataxie (≥ 10 mg/kg) beobachtet; bei Hündinnen (≥ 10 mg/kg) ebenfalls Tremor und Ataxie, außerdem Inkoordination, Taumeln und ein allgemein reduzierter Gesundheitsstatus (20 mg/kg).

Bei geringerer Dosierung (5 mg/kg) waren Tremor und Ataxie bei männlichen Tieren nur vereinzelt zu beobachten (EMA, 2005).

4.2.2 Weitere Anmerkungen

Bei den für diese Arbeit ausgewerteten Fällen von Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® beim Hund, war kein Zusammenhang zwischen dem Alter oder Gewicht der Tiere und der Dauer oder dem Schweregrad der Symptome erkennbar.

Das Gewicht der Tiere Fällen lag (soweit bekannt und mit einigen Ausnahmen) im rasse-typischen Rahmen. Das angegebene Alter betrug wenige Monate bis 16 Jahre.

In einigen der uns gemeldeten Fälle wurde konkret von Begleiterkrankungen und/oder Begleitmedikationen berichtet. Da es sich um eine retrospektive Studie handelt, bei der nicht immer die kompletten Informationen in Erfahrung gebracht werden konnte, können auch in allen anderen hier dargelegten Fällen Erkrankungen oder die Anwendung weiterer AM nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Im Folgenden soll auf die besonderen Fälle eingegangen werden, in den Begleiterkrankungen oder -medikationen bekannt waren.

Eins der Tiere (MDR1^{-/-}) litt bekanntlich unter Epilepsie, entwickelte aber nur selten Anfälle (1-2 Mal pro Jahr) und die beschriebenen Arzneimittelunverträglichkeiten zeigten den gleichen Verlauf und Charakter wie bei anderen betroffenen Hunden.

Ein weiteres Tier (MDR1^{-/-}) erhielt zeitgleich mit der Profender® Gabe eine nicht näher beschriebene Impfung. Die gemeldeten Symptome entsprachen allerdings denen anderer Fälle.

Ein anderer Hund (MDR1^{-/-}) hatte bereits vor der Profender® Anwendung Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Gabe von Dolpac® gezeigt. Dieses Präparat enthält die Wirkstoffe Oxantel, Pyrantel und PZQ. Letzteres ist auch in Profender® enthalten.

Es besteht in einem weiteren Fall (MDR1^{+/+}) ebenfalls die Vermutung, die gemeldeten Arzneimittelunverträglichkeiten könnten andere Ursachen haben. Es wurde von blutigem

Erbrechen und blutiger Diarrhoe berichtet, wobei Erbrechen bereits nach früheren Profender® Anwendungen aufgetreten sein soll. Weitere Symptome, wie das sonst sehr typische Zittern oder eine Ataxie sowie Salivation, traten allerdings nicht auf.

Bei einem weiteren Tier (MDR1-Status unbekannt) wurde einen Tag nach Profender® auch das Präparat Galastop® (Wirkstoff Cabergolin, ein Dopamin-Agonist) angewendet. Symptome traten erst einen Tag später auf und stimmten auch nur teilweise mit der ansonsten bei Arzneimittelunverträglichkeiten nach Profender® Gabe berichteten Symptomatik überein. Ein Rückschluss auf eines der beiden Präparate ist also auch in diesem Fall nicht möglich.

Schließlich entwickelte eins der Tiere (MDR1-Status unbekannt) in zeitlichem Zusammenhang zur Profender® Anwendung eine Milztorsion. Einige oder sogar alle der genannten Symptome könnten daher auf die starke Belastung durch die Torsion zurück zu führen sein.

Es muss also beachtet werden, dass in vielen Fällen ein Rückschluss auf die Anwendung von Profender® als Ursache der Arzneimittelunverträglichkeiten nicht zweifelsfrei möglich war.

4.3 Symptomatik und mutmaßlicher Toxizitätsmechanismus

Die durch Profender® beim Hund hervorgerufenen Symptome lassen sich zwar nicht zweifellos auf einen der beiden im Präparat enthaltenen Wirkstoffe zurückführen, allerdings hat das seit langer Zeit verwendete PZQ bekanntlich eine sehr hohe therapeutische Breite (Frohberg und Schulze, 1981; EMEA 1996; Cioli und Pica-Mattoccia, 2003; Dayan, 2003). Auch ist bisher keine erhöhte Empfindlichkeit bei MDR1-defekten Hunden gegenüber PZQ bekannt. Des Weiteren besteht bei PZQ eine Korrelation zwischen Arzneimittelunverträglichkeiten und Infektionsgrad (Cioli und Pica-Mattoccia, 2003). Je größer die Wurmbürde, desto heftiger die Arzneimittelunverträglichkeiten. Da PZQ sehr schnell und effektiv wirkt, sterben dabei nahezu alle Parasiten zur gleichen Zeit ab und setzen Stoffwechselprodukte frei, die zu den klinischen Symptomen beitragen bzw. diese hervorrufen können (Poldermann et al., 1984). In seltenen Fällen kann PZQ beim Hund zu Erbrechen, Durchfall und Anorexie führen (perorale Gabe, ab 50 mg/kg). Auch neurotoxische Symptome sind möglich, wenn PZQ parenteral angewendet wird (Plumb, 2005). Die dafür erforderlichen Dosen können allerdings aufgrund der emetischen Wirkung oral nicht aufgenommen werden (Riviere und Papich, 2009). Im Experiment zeigte sich eine verstärkte und verlängerte Symptomatik nach der gleichzeitigen Anwendung beider Wirkstoffe im Vergleich zur Einzelapplikation. Die dabei ermittelten Dosen lagen

jedoch weit über denen, in welchen Profender® in der Zieltierart angewendet wird (EMA, 2005).

Allerdings gibt es auch für PZQ Hinweise auf eine Interaktion mit MDR1-verwandten Transportern. So exprimiert der Parasit *Schistosoma mansoni* nach Exposition mit PZQ mehr MDR1 und die PZQ Empfindlichkeit nimmt ab (Messerli et al., 2009). Dies erklärt möglicherweise die in präklinischen Studien an Ratten beobachtete erhöhte Toxizität bei der kombinierten Anwendung beider Substanzen. Die dabei verwendeten Dosen lagen allerdings weit über der für die Zieltierart empfohlene Dosierung (EMA, 2005). Fehlt MDR1 komplett (Genotyp MDR^{-/-}) spielt dieser Umstand allerdings vermutlich keine Rolle. Ob ein Einfluss auf die Wirkung bei heterozygot (MDR1^{+/-}) oder gar nicht (MDR1^{+/+}) betroffenen Tieren besteht, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. In anderen Studien an MDR1-Zelllinien konnte keine PZQ induzierte Rh123 Akkumulation in den Zellen nachgewiesen werden. Die Autoren weisen allerdings darauf hin, dass es für beide Substanzen unterschiedliche Bindungsstellen am MDR1-Transporter geben könnte (Dupuy et al., 2010). In einem an unserem Institut durchgeführten Versuch mit der gleichen Zelllinie wie unter 2.3.1 beschrieben, konnte für PZQ jedoch eine deutliche Interaktion mit dem MDR1-Transporter nachgewiesen werden (Charlotte Straehle, personal communication).

Obwohl auch PZQ unter bestimmten Bedingungen (parenteral angewendet, siehe oben) neurologische Symptome wie Ataxie verursachen kann, kann dennoch davon ausgegangen werden, dass die neurologischen Symptome hauptsächlich oder sogar ausschließlich von EMO hervorgerufen werden.

Weiterhin kann vermutet werden, dass die Symptomatik tatsächlich vor allem zentral vermittelt wird. Da der Plasmaspiegel von EMO in den eigenen Untersuchungen bei MDR1-intakten und MDR1-defekten Mäusen nahezu gleich war, müssten bei einer Beteiligung des peripheren Nervensystems Hunde aller MDR1-Genotypen gleichermaßen betroffen sein, ebenso vermutlich auch Katzen. Zu bedenken ist dabei allerdings die Tatsache, dass die Plasmawerte nur zu einem Zeitpunkt gemessen wurden. Die maximale Plasmakonzentration könnte zwischen PGP^{mut} und PGP^{WT} Mäusen dennoch variieren und eine Rolle bei der Toxizität spielen. Das Fehlen von MDR1 in der BHS wird nach den hier durchgeführten Studien aber dennoch für den Hauptfaktor bei der Entstehung von Arzneimittelunverträglichkeiten nach Gabe von Profender® bei Hunden angesehen.

Die vielfältige Symptomatik lässt einen komplexen Toxizitätsmechanismus vermuten. Hauptsächlich scheint das Nervensystem betroffen zu sein, wobei es vor allem Anzeichen für eine Übererregung gab. Dafür sprechen vor allem die sehr häufig beschriebenen Symptome Zittern/Zuckungen/Krämpfe, Ataxie, Nervosität (bis hin zu Schlaflosigkeit), Salivation, Hecheln und Tachykardie. Andererseits traten, teilweise bei denselben Tieren, auch Symptome auf, die auf eine zentrale Depression hinweisen (Apathie, Lähmungs-

erscheinungen, u.a.). Möglicherweise ist dies auf eine Erschöpfung der exzitatorischen Systeme im Nervensystem zurückzuführen.

Die Funktion des Nervensystems wird erfüllt durch verschiedene Neurotransmitter, die Reize von einer Nervenzelle auf die nächste übertragen. Diese Neurotransmitter können nachfolgende Nervenzellen entweder erregen (exzitatorische Neurotransmitter: Glutamat (Glu), Aspartat, Acetylcholin (ACh), Noradrenalin (NA)) oder hemmen (inhibitorische Neurotransmitter: γ -Aminobuttersäure (GABA), Glycin, Serotonin (5-HT), Dopamin (D)). Das Zusammenspiel dieser exzitatorischen und inhibitorischen Strukturen im zentralen Nervensystem ist äußerst komplex. Verschiedene Neurone können einander gegenseitig beeinflussen, sodass der Nettoeffekt nicht immer klar einer von beiden Funktionen zugeordnet werden kann (Neuromodulation). So führt die Erregung eines inhibitorischen Neurons beispielsweise zu einer Verminderung der gesamten Erregung. Auch verfügt ein Neuron oft über mehr als nur einen Neurotransmitter (Cotransmission).

Wichtig für einen störungsfreien Ablauf aller neuronalen Vorgänge ist das Gleichgewicht zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Neurotransmittern (*Forth et al., 2001; Burnstock, 2004; Trudeau und Gutierrez, 2007*).

Da das Nervensystem übergeordnet alle Organsysteme steuert, kann es bei Funktionsstörungen zu vielfältigen Symptomen kommen. Rückschlüsse auf die Beteiligung eines bestimmten Neurotransmittersystems an der EMO-induzierten Symptomatik sind an dieser Stelle allerdings noch nicht möglich. Die beschriebenen Störungen der Muskelkoordination deuten darauf hin, dass es sich nicht um eine klassische Krampfsymptomatik handelt. Krämpfe dieser Art können in der Regel mit GABA_A Agonisten (Benzodiazepinen, Barbituraten, Propofol u.a.) behandelt werden.

Diese AS verstärken den Einfluss des inhibitorischen Neurotransmitters GABA und vermindern dadurch die krampfauslösende Übererregung des ZNS.

In den in dieser Arbeit ausgewerteten Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® beim Hund wurde in einigen Fällen von Therapieversuchen mit Diazepam (sowie vereinzelt Barbituraten und Propofol) berichtet. Dabei stellte sich keine oder lediglich eine geringgradige Verbesserung der Symptomatik ein. Dies bestätigt die Vermutung eines komplexeren Geschehens mit Beteiligung anderer bzw. zusätzlicher Neurotransmitter-Systeme.

Die beschriebenen Symptome zeigten teilweise Übereinstimmungen zu denen des so genannten Serotonin-Syndroms (Verhaltensänderungen, Muskelzucken, Zittern, Ruhelosigkeit, Schwitzen u.a.) des Menschen, welches durch eine zu hohe Konzentration an Serotonin selbst oder Serotonin-Agonisten hervorgerufen wird. Serotonin (Serotonin = 5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist von Bedeutung für Schlaf, Aufmerksamkeit und Stimmungslage (*Mohammad-Zadeh et al., 2008*). Wie beim Menschen ist die Hauptursache eines zu hohen 5-HT

Werts bei Tieren meist iatrogen bedingt und auf die versehentliche oder zu hoch dosierte Einnahme verschiedener den 5-HT Spiegel erhöhender AS zurückzuführen (trizyklische Antidepressiva, selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, Monoaminoxidase-Hemmer).

Der Effekt eines zu hohen 5-HT Spiegels ist auch bei verschiedenen Tierarten inzwischen gut beschrieben.

Beim Hund zeigt sich (je nach Wirkstoffklasse und Dosierung in unterschiedlicher Ausprägung und Häufigkeit) vor allem folgende Ausprägung: Lethargie, Erbrechen, Mydriasis, Agitation, Hyperaktivität, Ataxie, Depression, Tachycardie, Tremor, Vokalisation, Somnolenz, Hypersalivation, Anorexie, Hyperthermie, Tachypnoe, Unruhe/Aufregung, Krämpfe, Hyperästhesie, Orientierungslosigkeit, Depression, Hyperästhesie, Hinweise auf Abdominalschmerz, Hypersalivation, Hyperthermie, vorübergehende Blindheit, Tod (*Gwaltney-Brant et al., 2000; Mohammed-Zadeh et al., 2008; Thomas et al., 2012*).

Dabei können viele der Symptome nicht ausschließlich durch einen Überschuss an 5-HT ausgelöst werden, sondern die beteiligten Systeme unterliegen ebenfalls einer Beeinflussung durch weitere Neurotransmitter wie D, ACh und NA.

Auch das Serotoninsyndrom in Mäusen zeigt Übereinstimmungen zu den in den PGP^{mut} beobachteten Symptomen nach der Applikation von EMO. Es äußert sich zum Beispiel durch Kopfzucken, Veränderungen der Körpertemperaturen, Hyperaktivität und Veränderungen der Lokomotion, Salivation, verändertes Verhalten u.a. (*Haberzettel et al., 2013*) (siehe auch 4.4).

Auch die Beteiligung anderer Neurotransmittersysteme, wie des D oder ACh Systems, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden.

4.3.1.1 Mögliche Rezeptoren

In Invertebraten konnte gezeigt werden, dass EMO an den LAT-1 Rezeptor und SLO-1-Kanäle bindet und über diese Strukturen seine Hauptwirkung vermittelt. Für beide Strukturen gibt es Säugerhomologe.

Latrotoxinrezeptor

LAT-1 wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, in geringem Umfang ist LAT-1 aber nahezu in allen Geweben nachweisbar (dort vermutlich in neuronalen und endokrinen Zellen) (*Matushita et al., 1999; Welz et al., 2005; Martinez et al., 2011; Silva und Ushkaryov, 2010; O'Sullivan et al., 2012*).

Die physiologische Funktion der Rezeptoren war sehr lange unbekannt. Erst in jüngster Zeit wurden endogene Liganden bzw. Bindungspartner gefunden (*Silva et al., 2011; Boucard et al., 2012; O'Sullivan et al., 2012*).

Das präsynaptisch lokalisierte LAT-1 bildet mit postsynaptischen Bindungspartnern Verbindungen über den synaptischen Spalt aus. Gemeinsam sind sie an der Bildung und

Entwicklung von Synapsen beteiligt und sind wichtig für die Funktion neuronaler Kreisläufe (Silva und Ushkaryov, 2010; Silva et al., 2011; Boucard et al., 2012; O'Sullivan et al., 2012).

Mutationen in LAT-1 (und/oder LAT-3) oder dessen Bindungspartnern sind assoziiert mit Gehirnmissbildungen, ADHS, Schizophrenie, bipolaren Störungen, Autismus, Ängstlichkeit und mentaler Retardierung (Martinez et al., 2011; Silva und Ushkaryov, 2010; Silva et al., 2011; Boucard et al., 2012; O'Sullivan et al., 2012). Bei einer Therapie mit Antipsychotika (Risperidon: Antagonist am D- und 5-HT-Rezeptor) wird LAT hochreguliert (Silva et al., 2011).

LAT-1 KO Mäuse zeigen ebenfalls einen schizoiden Phänotyp, welcher sich in fehlendem Mutterverhalten (kein Nestbau, Vernachlässigung der Nachkommen) und zunehmender Aggressivität äußert (Martinez et al., 2011; Silva und Ushkaryov, 2011). Die Hypothese, dass es durch eine Stimulation von LAT-1 zu Verhaltensveränderungen kommen könnte wurde bereits 2011 von Silva et al. aufgestellt. In der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messung der Neurotoxizität von EMO zeigten die PGP^{mut} Mäuse nach der Applikation von EMO ebenfalls Verhaltensveränderungen, die länger anhielten als die motorischen Symptome (Ataxie, Hyperkinesie). Die Tiere waren ängstlich, schreckhaft (vor allem bei Berührung, gelegentlich mit Aufschreien) und wirkten teilweise orientierungslos. Es kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass dieses Verhalten teilweise trotz vorheriger Gewöhnung der Tiere an Personal und Geräte auch auf den allgemeinen durch den Versuch verursachten Stress (vermehrtes Handling, Applikation der Testsubstanz) zurückzuführen sein könnte. Zumindest zeigte aber keines der Tiere vor oder nach dem Versuch Verhaltensauffälligkeiten.

Der Name der Latrotoxin-Rezeptoren leitet sich vom im Gift der *Schwarzen Witwe* (*Latrodectus* spp.) enthaltenen α -Latrotoxin (LTX) ab, welches von LAT-1 gebunden wird. Die LTX Vergiftung ähnelt den durch EMO hervorgerufenen Symptomen in vielen Punkten. Die Symptome entsprechen einander größtenteils, sind nur im Fall von EMO weniger heftig ausgeprägt. Hinzu kommt bei der LTX Vergiftung ein extremes, oft therapieresistentes Schmerzempfinden (Jelinek, 1997; Peterson, 2006).

Die zahlreichen Arten der *schwarzen Witwen* sind fast weltweit verbreitet. In den nördlichen Teilen Amerikas und Eurasiens, sowie in Mitteleuropa und Ostasien kommt sie nicht vor. Die Spinnen sind schwarz und haben häufig rote Flecken auf dem Rücken sowie eine charakteristische rote Zeichnung in Form einer Sanduhr auf der Unterseite (Mebis, 2010).

Das Toxin führt zur massiven Ausschüttung von ACh und NA bis zur Erschöpfung des kompletten Transmittervorrats. Auch andere Synapsen reagieren auf das Toxin (D, Glu, Enkephaline) (Jelinek, 1997; Peterson, 2006). Besonders empfindlich reagieren Katzen, bei denen die Vergiftung häufig einen letalen Verlauf nimmt. Hunde zeigen sich geringer empfindlich, können aber auch eine schwere Klinik entwickeln. Ein einzelner Biss kann zu einem letalen Vergiftungsverlauf führen (Twedt et al., 1999; Peterson, 2006). Viele Organsysteme sind betroffen.

Es kommt zu heftigen Muskelkrämpfen (teilweise Tetanus-ähnlich) mit sehr starken Schmerzen, Schweißausbrüchen, Ataxie, Zittern, Paralyse, Tachycardie, Hypertonie, Erbrechen, Durchfall, Hypersalivation (teilweise auch Hyposalivation), Hyperpnoe, geröteten Konjunktiven (teilweise Tränenfluss), verhärtetes Abdomen mit Druckempfindlichkeit, Vokalisation, Halluzinationen, Angst, Panik und Aufregung. Schlaflosigkeit, Lethargie, Müdigkeit und Schwäche halten teilweise Wochen bis Monate lang an. Wie bei der EMO-Vergiftung treten die Symptome sehr schnell etwa 10 min bis 2 Stunden nach der Exposition auf und dauern in der Regel zwischen 12 und 72 Stunden an. Dabei lässt der Schmerz nur langsam nach und es kommt nach einigen Tagen häufig zu Hautausschlag. Allerdings ist auch ein asymptomatischer oder lokaler Vergiftungsverlauf möglich (*Mebs, 2010, Jelinek, 1997; Twedt et al., 1999; Peterson, 2006*).

Es existiert ein Antiserum, die Erfahrungen damit sind unterschiedlich. Während das Antiserum vor allem in Australien seit langem erfolgreich eingesetzt wird, ist es in den USA auf Grund häufiger allergischer Reaktionen Risikopatienten und besonders schweren Fällen vorbehalten. Diese unterschiedliche Handhabung lässt sich vermutlich auf die abweichende Anwendung des Antiserums zurückführen. Anders als in anderen Ländern wird das Antiserum in den USA in aller Regel intravenös injiziert. Dennoch führt nur das Antiserum zu einer schnellen und effektiven Verbesserung der Symptome, meist innerhalb von 30 min mit einer kompletten Regeneration nach ca. 4-6 Stunden. Patienten, die nach 2 Stunden noch keine Verbesserung zeigen, können eine zweite Ampulle des Antiserums erhalten (*Jelinek, 1997; Twedt et al., 1999; Peterson, 2006*).

Ist kein Antiserum vorhanden, kann die LTX Vergiftung symptomatisch therapiert werden mit Methocarbamol, Diazepam und Opioiden gegen die Schmerzen, die allerdings oft nicht helfen. Unterstützend wird die Anwendung von Calciumglukonat empfohlen, welches die Schmerzen schnell aber nur vorübergehend mindern kann (*Jelinek, 1997; Twedt et al., 1999; Peterson, 2006*).

Ein potenzieller weiterer endogener Ligand des LAT-1 ist PF1, ein Vertreter einer bestimmten Gruppe von Neuropeptiden (FMRFamide like neuropeptide = FLPs), welche in Nematoden ähnliche Effekte hervorrufen wie EMO (Hyperpolarisation, Paralyse) und ACh/Levamisol⁴ induzierte Kontraktionen antagonisiert. Die Wirkung scheint dabei von Stickstoffmonoxid vermittelt zu werden. Es wird vermutet, dass EMO entweder die Freisetzung von PF1 stimuliert oder die Wirkung des Neuropeptids imitiert (*Mühlfeld et al., 2009; Verma et al., 2009*). Eine direkte Freisetzung von PF1 durch EMO gilt inzwischen allerdings als unwahrscheinlich (*Martin et al., 2011*). FLPs sind in verschiedenen Nematoden in die neuronale und neuromuskuläre Aktivität sowie das Fütterungsverhalten involviert (*Mühlfeld et al., 2009*).

⁴ Levamisol: Agonist am nicotinergen ACh Rezeptor der Parasiten = imitiert hier die ACh Wirkung

SLO-1-Kanäle

SLO-1-Kanäle sind sowohl in Muskelzellen als auch in Neuronen (sowie Drüsengewebe) sehr weit verbreitet und erfüllen dort eine Vielzahl physiologischer Aufgaben. Unter anderem regulieren sie präsynaptisch die Freisetzung von Neurotransmittern und beeinflussen postsynaptisch deren Wirkdauer. Ihre Hauptfunktion erfüllen sie aber präsynaptisch in Neuronen. Eine Aktivierung führt zu einer verminderten Erregbarkeit der entsprechenden Neurone.

Ihre genaue Funktion wird von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst. Beispielsweise kommen sie sowohl auf exzitatorischen als auch auf inhibitorischen Neuronen vor und sind je nach Zelltyp an unterschiedliche weitere Signalkaskaden innerhalb der Zellen gekoppelt.

Der durch SLO-1 vermittelte Effekt kann daher unterschiedlich sein. So führen sie durch negative Rückkopplung zu einer verminderten ACh Freisetzung und damit zu einer Reduktion der Erregung. Bei Expression auf GABAergen Interneuronen führt die verminderte Neurotransmitterfreisetzung andererseits zu einer erhöhten Gesamterregung, da der hemmende Einfluss von GABA entfällt („Hemmung der Hemmung“).

In verschiedenen Studien äußerte sich eine Blockade der SLO-1-Kanäle entweder in einer vermehrten oder einer verminderten Neurotransmitterfreisetzung. Zum Teil war gar kein Effekt zu beobachten. Evtl. erfüllen die SLO-1-Kanäle eine duale Funktion, indem sie eine geringe Neuronenaktivität verstärken, aber eine hohe Neuronenaktivität limitieren (*Vergara et al., 1998; Wang et al., 2001; Davies et al., 2003; Salkoff et al., 2006; Holden-Dye et al., 2007, 2012; Guest et al., 2007; Crisford et al., 2011*).

Bei Mutationen im SLO-1-Gen, die zu einem Funktionsverlust der Kanäle führen, zeigen betroffenen Organismen (*C. elegans*) ebenfalls Koordinationsstörungen mit abgehakten Bewegungen sowie plötzliche Stopps und nachfolgendem Richtungswechsel. Außerdem kommt es zu einer vermehrten ACh Freisetzung und zu einer Resistenz gegenüber EMO und Ethanol (*Wang et al., 2001; Davies et al., 2003; Guest et al., 2007; Holden-Dye et al., 2007*). Auch SLO-1 KO Mäuse fallen unter anderem durch Bewegungsstörungen auf (*Du et al., 2005; Salkoff et al., 2006*).

Bei einer Überaktivität der SLO-1-Kanäle zeigen sich Symptome wie nach einer Behandlung mit EMO oder Ethanol sowie bei verminderter ACh-Freisetzung. Die Tiere zeigten unphysiologische Bewegungen, die vermutlich auf ein Ungleichgewicht zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmittern zurückzuführen sind (*Wang et al., 2001; Davies et al., 2003; Guest et al., 2007; Holden-Dye et al., 2007*).

Im Menschen wurde eine Korrelation zwischen einer Mutation im SLO-1-Gen und dem Auftreten von Epilepsie und paroxysmalen Bewegungsstörungen nachgewiesen. Die Mutation führt zu einer erhöhten Sensitivität der Kanäle auf Ca^{2+} und damit zu einer vermehrten Aktivität von SLO-1. Durch die dadurch bedingte schnellere Repolarisation der

Nervenzellen sind diese auch früher wieder erregbar und die Feuerfrequenz der Neuronen steigt (Du et al., 2005).

Fazit zur möglichen Rezeptorinteraktion von EMO

Die deutliche Ähnlichkeit der Arzneimittelunverträglichkeit nach Gabe von Profender® mit der LTX-Vergiftung weist darauf hin, dass auch im Säuger LAT-1 eine Zielstruktur von EMO sein könnte.

Die SLO-1-Kanäle kommen im Säuger ebenfalls als Rezeptor für EMO in Frage. Dafür sprechen unter anderem die teilweise Überschneidung der Symptome mit der Ethanol-Intoxikation sowie der Zusammenhang zwischen einer Überaktivität dieser Kanäle und dem Auftreten von Epilepsie und Bewegungsstörungen.

Beide Systeme sind schon in den niedriger entwickelten Modelorganismen außerordentlich komplex. Diese Komplexität erklärt evtl. die Vielfältigkeit der Symptome, sowie die Unterschiede in Ausprägung und Dauer der Symptome nach EMO-Gabe.

Auch gibt es sowohl für LAT-1 als auch für SLO-1 jeweils verschiedene Varianten, die möglicher Weise einen Einfluss auf die individuelle Reaktion auf EMO bei Mäusen und Hunden haben (Salkoff et al., 2006; Martinez et al., 2011; Silva und Ushkaryov, 2010; Crisford et al., 2011).

Zusätzlich könnten beide Zielstrukturen miteinander interagieren. Da eine Aktivierung von LAT-1 zu einer Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} führt und SLO-1 wiederum von Ca^{2+} aktiviert wird, werden zumindest in den Invertebraten in einigen Geweben (Pharynx) die SLO-1-Kanäle teilweise über LAT-1 gesteuert (Guest et al., 2007; Holden-Dye et al., 2007).

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass EMO auch im Säuger die synaptische Übertragung beeinflusst und so die Balance zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Neurotransmittern stört, wobei der genaue Wirkmechanismus zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht endgültig aufgeklärt ist.

4.3.1.2 Therapiemöglichkeiten

Da bisher die Zielstrukturen für EMO im Vertebraten nicht genau bekannt sind, steht zum aktuellen Zeitpunkt kein spezifisches Antidot zur Verfügung. Die Therapie kann daher nur symptomatisch erfolgen, wobei auch dabei grundsätzlich keine Therapieempfehlung gegeben werden kann. Theoretisch stehen alle Maßnahmen zur Giftelimination (Erbrechen auslösen, Infusion, Diurese, etc.) zur Verfügung. Ob diese auch im Fall der Arzneimittelunverträglichkeiten nach Anwendung von Profender® sinnvoll sind, kann nicht abschließend gesagt werden, da entsprechende Erfahrungen fehlen und bisher in allen uns bekannten Fälle die Symptome auch ohne Behandlung nach unterschiedlicher Zeit von alleine wieder abklingen. Da allerdings teilweise von einem hochgradigen Verlauf berichtet

wurde, empfiehlt sich dennoch ein Therapieversuch, um das Leiden der Patienten möglichst zu vermindern. Dabei richtet sich die Therapie nach der auftretenden Symptomatik.

Bei Krampfanfällen können diese mit Benzodiazepinen und wenn notwendig mit Barbituraten oder Propofol therapiert werden. Im Fall von Profender® zeigten diese Medikamente in den hier beschriebenen Fällen allerdings teilweise keine bzw. teilweise nur eine leichte Verbesserung der Symptomatik.

Dennoch besteht auch in diesem Fall die Möglichkeit, dass eine generelle zentrale Dämpfung zumindest die zusätzliche Symptomatik verbessert. Vor allem die durch die Benzodiazepine vermittelte Anxiolyse könnte sich auf den Symptomkomplex Aufregung/Nervosität/Schlaflosigkeit positiv auswirken.

Bei einem der hier ausgewerteten Fälle zeigte angeblich der Einsatz von Physostigmin eine positive Wirkung. Dies wurde bisher nicht wiederholt oder experimentell überprüft. Außerdem weist Physostigmin eine sehr geringe therapeutische Breite auf. Als Carbamat hemmt Physostigmin die ACh-Esterase und damit den Abbau von ACh. Eine Minderung der Krämpfe bzw. des Zitterns durch Physostigmin erscheint daher zunächst paradox, da es selber ähnliche Symptome hervorruft. Da aber sowohl ein Überschuss (simuliert z.B. durch ACh Rezeptor Agonisten wie Nicotin oder ACh-Esterase-Hemmer wie Physostigmin) als auch ein Mangel an ACh (simuliert durch ACh-Rezeptor Antagonisten wie z.B. Atropin) teilweise zu ähnliche Symptome führen, besteht die Möglichkeit, dass im späteren Verlauf der Vergiftung nach einer möglichen Erschöpfung des ACh Vorrats die Gabe von Physostigmin tatsächlich zu einer Verbesserung beitragen könnte. Viele der durch EMO hervorgerufenen Symptome ähneln zu einem großen Teil der Atropin-Intoxikation (Mydriasis, Tremor/Krämpfe, Tachycardie, Hyperthermie, Unruhe, Ataxie - später Lähmung, Hyperpnoe, Verwirrung) gegen die Physostigmin als spezifisches Antidot eingesetzt wird. Der zugrunde liegende Mechanismus muss allerdings nicht in beiden Fällen übereinstimmen. Daher kann die Anwendung von Physostigmin zum jetzigen Zeitpunkt keinesfalls empfohlen werden.

Zum Einsatz anderer Muskelrelaxantien (als Benzodiazepinen) bestehen in diesem Fall keine Erfahrungen. Da es sich aber sehr wahrscheinlich um eine zentral vermittelte Symptomatik handelt, könnte auf ebenfalls zentral wirksame Muskelrelaxantien zurückgegriffen werden. Beispielsweise ist bekannt, dass bei einer anderen relativ häufigen Vergiftung in der Kleintierpraxis – der Permethrin-Intoxikation der Katze – das zentrale Muskelrelaxanz Methocarbamol einen positiven Effekt auf die Krampfsymptomatik hat (*Wedel und Wilke, 2008; Osweiler et al., 2011*). Es kann auch eingesetzt werden zur symptomatischen Therapie der LTX Vergiftung (*Jelinek, 1997; Twedt et al., 1999*).

Zur Behandlung der LTX-Vergiftung wird teilweise auch Dantrolen eingesetzt (*Osweiler et al., 2011*), welches als myotropes Spasmolytikum die Ca^{2+} Freisetzung aus dem

sakroplasmatischen Retikulum und dadurch Muskelkontraktionen unabhängig von der durch den ACh Rezeptor vermittelten Signalkaskade verhindert.

Der Einsatz von Neuroleptika zur Beruhigung der Patienten wird in diesem Fall als kritisch gesehen, da diese den Muskeltonus erhöhen und die Krampfschwelle herabsetzen. Sollte der genaue Wirkmechanismus von EMO tatsächlich zu einer eher parkinsonoiden Symptomatik führen, könnten klassische Neuroleptika als D-Antagonisten diese Symptomatik zusätzlich verstärken. Auch atypische Neuroleptika, deren Affinität zum 5-HT-Rezeptor höher ist als die zum D-Rezeptor, wirken nicht antikonvulsiv, könnten aber als 5-HT-Antagonisten evtl. andere Symptome mindern, die im Zusammenhang mit dem Serotonin-Syndrom stehen. In der Humanmedizin wird das Serotonin-Syndrom mit dem Antihistaminikum Cyproheptadin behandelt, welches neben dem Histamin-1 Rezeptor auch antagonistisch an 5-HT- und (weniger) an ACh-Rezeptoren wirkt (*Graudins et al., 1998*). Auch bei Tieren wurde es bereits eingesetzt (*Osweiler et al., 2011*). Solange der Wirkmechanismus von EMO im Säuger allerdings nicht vollständig aufgeklärt ist, kann keine bestimmte Therapie und keiner der genannten Wirkstoffe oder Wirkstoffgruppen – evtl. mit Ausnahme der Benzodiazepine - empfohlen werden.

Ansatzpunkte für mögliche spezifische Therapeutika könnten auch bereits durchgeführte Studien zur Wirkungshemmung von EMO *in vitro* oder an Invertebraten liefern. Dabei ist allerdings zu beachten, dass viele der dort verwendeten Substanzen aufgrund ihrer hohen Toxizität für den klinischen Einsatz nicht in Frage kommen und daher nur von wissenschaftlichem Interesse sind. Auch kann nicht davon ausgegangen werden, dass in Experimenten an Zellkulturen und Invertebraten vielversprechende Substanzen die gleiche Wirkung in höheren Organismen mit komplexeren Körperfunktionen haben. Es besteht aber dennoch die Möglichkeit, mit Hilfe der so gewonnen Informationen weniger toxische Substanzen mit gleichen Zielstrukturen zu finden.

Das durch EMO hervorgerufene Zittern bzw. die Krämpfe/Zuckungen beeinträchtigen – zumindest bei starker Ausprägung – eventuell den Muskelstoffwechsel. Durch die erhöhte Muskelbeanspruchung steigt der Sauerstoffverbrauch stark an und es kommt vermehrt zur anaeroben Glykolyse, wodurch in erhöhtem Maße Lactat anfällt. Gegebenenfalls ist daher der Blut-pH-Wert zu kontrollieren und mit entsprechenden Infusionslösungen (Natriumbikarbonat) zu regulieren.

Durch Muskelschäden kann es zum Austritt von Kreatinkinase und K^+ ins Blutplasma kommen. Beide Werte können ebenfalls im Blut gemessen und kontrolliert werden.

Auch Myoglobin kann aus dem geschädigten Muskel austreten und sich bei hohen Konzentrationen in den Nierentubuli ablagern und die Funktion der Nieren beeinträchtigen.

Die durch das Zittern oder Krampfen hervorgerufenen Kontraktionen der Muskulatur können bei starker Ausprägung zu Wärmeentwicklung führen. Die Körpertemperatur sollte daher überwacht und der Patient wenn nötig gekühlt werden.

4.3.1.3 Anwendung von Profender® Tabletten in der tierärztlichen Praxis

Obwohl die sichere Anwendung von Profender® Tabletten auch bei MDR1^{-/-} Hunden bestätigt wurde, empfiehlt sich vor der Anwendung ein Test auf das Vorliegen der MDR1 nt230(del4) Mutation, da in den hier ausgewerteten Fällen und in der Studie an PGP^{mut} Mäusen lediglich der MDR1-Genotyp einen Zusammenhang zum Auftreten von Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® bzw. EMO erkennen ließ.

Aus diesem Grund sollte die Anwendung des Präparates bei diesen Tieren mit besonderer Sorgfalt erfolgen.

Die empfohlene Mindest-Dosis von 1 mg/kg EMO sollte dabei so genau wie möglich eingehalten werden. Da die Dosierung mit den vorhandenen Tablettengrößen nur stufenweise erfolgen kann, könnte im Zweifelsfall das Gewicht des Tieres eher nach unten anstatt (wie sonst üblich) nach oben gerundet werden. Profender® darf nicht angewendet werden bei Tieren die leichter als 1 kg sind. Darauf wird auch durch den Zulassungsinhaber hingewiesen. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die geringste mögliche Dosierung (½ Tablette Profender® für kleine Hunde) umgerechnet immer noch einer Dosis von 1,5 mg entspricht. Dosierungen bis 1,6 mg/kg EMO (und 8 mg/kg PZQ) wurden in einer präklinischen Studie an MDR1^{-/-} Collies gut toleriert. Ab 2 mg/kg EMO (und 10 mg/kg PZQ) traten allerdings teilweise bereits Arzneimittelunverträglichkeiten auf. Über den Bereich zwischen 1,6 und 2 mg/kg EMO liegen entsprechend keine Informationen vor (EMA, 2005).

Die übliche Praxis, AM mit dem Futter einzugeben, sollte im Fall von Profender® auf jeden Fall vermieden werden! Für die sichere Anwendung muss die Applikation auf nüchternen Magen erfolgen. Das schließt auch kleine Futtermengen in Form von Belohnungen, Kaustangen oder Ähnlichem mit ein. Der Zulassungsinhaber empfiehlt, die Hunde über Nacht fasten zu lassen und auch erst 4 Stunden nach der Tablettengabe wieder zu füttern. Dies gilt für Hunde aller 3 MDR1-Genotypen. Bestehen Zweifel an der korrekten Umsetzung durch den Besitzer, sollte gegebenenfalls ein anderes Präparat abgegeben werden.

Nach der Tablettengabe ist es von Vorteil, MDR1^{-/-} Hunde zu überwachen bzw. in den folgenden 8 Stunden nicht alleine zu lassen. Treten in dieser Zeit keine Arzneimittelunverträglichkeiten auf, kann nach der Auswertung der hier beschriebenen Fälle davon ausgegangen werden, dass sich auch im Anschluss keine Symptome mehr entwickelt.

4.4 Wirkung von Emodepsid in MDR1-defekten Mäusen

Die in der vorliegenden Arbeit anhand der cMDR1-HEK293 Zellen gewonnenen *in vitro* Daten lassen bereits einen vermehrten Übertritt von EMO ins ZNS MDR1-defekter Tiere vermuten, welche sich im Versuchsteil „Gewebeverteilung von Emodepsid“ bestätigte. Da die alleinige Anwesenheit einer Substanz im ZNS keine Rückschlüsse auf eine neurologische bzw. neurotoxische Wirkung zulässt, konnte nur die durchgeführte Rotarod-Studie Aufschluss über diese Fragestellung geben. Zwar zeigten die bei der Gewebeverteilung verwendeten männlichen Mäuse ebenfalls 2 Stunden nach der EMO-Applikation Symptome, die allerdings lediglich subjektiv beurteilt und nicht objektiv gemessen wurden. Die Klinik war dabei tendenziell etwas weniger deutlich ausgeprägt als in den für die Rotarod-Studie verwendeten weiblichen Tieren. Sollte dies tatsächlich der Fall sein, könnten mehrere Ursachen dafür in Frage kommen. Zum einen könnten männliche PGP^{mut} Mäuse tatsächlich weniger empfindlich auf EMO reagieren als weibliche PGP^{mut} Mäuse. Dies könnte an geschlechtsspezifischen Unterschieden liegen oder an der bei weiblichen Mäusen unterschiedlichen Körperkonstitution (Gewicht, Körperfettanteil). Geschlechtsunterschiede wurden in präklinischen Studien in Mäusen und Ratten allerdings nur nach wiederholter Anwendung (17 Wochen) beschrieben, auf Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren nach einmaliger Anwendung gibt es bisher keine Hinweise (EMEA, 2005).

Andererseits könnte die Symptomatik auch nur weniger deutlich in Erscheinung getreten sein, da die in der Studie zu Gewebeverteilung von EMO verwendeten männlichen Tiere nach der Applikation in ihren gewohnten Gruppen zusammen blieben. In diesem Teil der Studie wurde ein mögliches Auftreten von Arzneimittelunverträglichkeiten nicht berücksichtigt und die Tiere deswegen lediglich zur Applikation separiert und anschließend bis zum Ende der Inkubationszeit in ihren gewohnten Käfig zurückgesetzt. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass einerseits eine Hyperkinesie und Ataxie aufgrund des geringeren Platzangebots pro Tier weniger auffiel und andererseits mögliche Symptome auch nicht durch Einzelhaltung bedingten zusätzlichen Stress potenziert wurden.

Das im Versuchsteil Rotarod in den weiblichen PGP^{mut} Mäusen beobachtete Symptombild nach der p.o. Applikation von 1 mg/kg EMO zeigte in vielen Punkten Übereinstimmungen zu den Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® beim Hund.

Auch bei den Mäusen stellte sich eher eine Übererregung mit komplexer Symptomatik dar. Teilweise zeigte sich allerdings – wie auch bei den Hunden – zusätzlich eine Depression mit Bewegungsunlust und verminderter Körperspannung.

Eine Ataxie war auch bei den Mäusen das deutlichste erkennbare Symptom, welches auf dem Rotarod gemessen und quantifiziert werden konnte. Zittern oder Zuckungen traten bei den Mäusen nicht auf. Evtl. wurden diese allerdings auch übersehen, da aufgrund der sehr

hohen Atem- und Herzfrequenz von Mäusen (bis zu 220/min respektive 840/min) (*Bogdanske et al., 2011*) generell häufig der Eindruck eines leichten Zitterns des Körpers entsteht. Tachypnoe oder Tachykardie konnte daher, sollten sie vorhanden gewesen sein, nicht explizit festgestellt werden.

Weiterhin auffällig waren zusätzliche motorische Symptome, die sich als eine Art Hyperkinesie darstellten (siehe 3.4.1.1). Das Bewegen des Kopfes und Vorderkörpers von rechts nach links war dabei typisch und trat sehr häufig auf. Solche Bewegungsabläufe zeigen sich bei den Tieren unter normalen Bedingungen nicht. Bei den weiterhin beobachteten Ausprägungen der Hyperkinesie (Aufstellen auf die Hintergliedmaßen, vermehrtes Laufen) handelt es sich zwar nicht um für Mäuse völlig untypische Verhaltensweisen, die Frequenz des jeweiligen Verhaltens war allerdings deutlich gesteigert. So sind Mäuse des verwendeten Stammes nach eigener Erfahrung gewöhnlich sehr zutraulich, ruhig und weniger bewegungsfreudig.

Zusätzlich zeigten sich Änderungen des Verhaltens in Form von Aufregung und Schreckhaftigkeit, teilweise besonders bei Berührung. Einzelne Tiere wirkten außerdem verwirrt, als wären sie einer völlig neuen Umgebung ausgesetzt und könnten sich darin nicht orientieren. Es ist nicht auszuschließen, dass vor allem zum Ende des Versuchs nach wiederholten Messungen sowie durch die während des Versuchs praktizierte Einzelhaltung ein gewisser Stressfaktor das Verhalten zusätzlich beeinflusst hat. Allerdings waren alle Tiere an beteiligte Personen und Apparaturen gewöhnt und deshalb durch Handling und Durchführung der im Versuch angewendeten Techniken im Training nicht aufgeregt. Vor und nach dem Versuch zeigte sich keines der Tiere verhaltensauffällig.

Bei der beobachteten Symptomatik fielen, ähnlich wie bei der berichteten Klinik beim Hund, Übereinstimmungen zum Serotonin-Syndrom bei der Maus auf.

Bei Nagern werden dabei von verschiedenen Autoren (mit unterschiedlicher Häufigkeit) hauptsächlich folgende Symptome genannt: Kopfbucken, Abspreizen der Hintergliedmaßen, Straub-Phänomen (S-förmig über den Rücken gebogener, steifer Schwanz), Kopfschütteln, Kopfpendeln, *flat body posture* (flache Körperhaltung/reduzierte Körperspannung), Rückwärtslaufen, Veränderungen der Körpertemperatur (nach oben oder nach unten), Hyperaktivität, Hyperreaktivität, Hinweise auf Angst, Piloerektion, Defäkation, Salivation, Schwitzen, Veränderungen der Lokomotion (erhöhte oder erniedrigte Aktivität), Aufrichten oder vermindertes Aufrichteverhalten, Treten auf den Vordergliedmaßen, Mydriasis, Verlust des Plantarreflexes (*Haberzettl et al., 2013*).

Der Verlauf der Intoxikation (Dauer, Schweregrad) war auch bei den Mäusen sehr verschieden. Einige Tiere brauchten sehr lange um sich von den Symptomen zu erholen und ihren Trainingsstand wieder zu erreichen, andere waren bereits nach 24 Stunden wieder

vollständig genesen. Grundsätzlich hielten die Verhaltensänderungen länger an als die Störungen der Muskelkoordination. Auch die Ausprägung war unterschiedlich stark. So waren die Symptome teilweise sehr deutlich erkennbar, teilweise traten sie nur geringgradig auf. Dabei konnte kein Zusammenhang zu Parametern wie Alter oder Gewicht der Tiere festgestellt werden. Auch zeigten Wurfgeschwister nicht grundsätzlich ein ähnlicheres Geschehen als nicht verwandte Tiere. Dies ist insofern nicht verwunderlich als dass CF1-Mäuse Auszuchttiere sind und sich deren Genetik daher von Tier zu Tier unterscheidet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die durch EMO hervorgerufenen Symptome in PGP^{mut} Mäusen mit den Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® in MDR1^{-/-} Hunden vergleichbar sind, auch wenn sie einander nicht komplett entsprechen. In beiden Fällen sind sowohl die Motorik als auch das Verhalten betroffen. Es scheint sich dabei überwiegend um eine Exzitation zu handeln, auch wenn teilweise zusätzlich Anzeichen einer Inhibition auftreten. In beiden Tierarten klingen alle Symptome ohne Therapie wieder ab, wenn auch nach sehr unterschiedlicher Zeitdauer. Sowohl Mäuse als auch Hunde zeigen sich offensichtlich unterschiedlich empfindlich auf die gleiche Konzentration derselben Substanz. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Fehlen von MDR1 in der BHS im Fall von EMO zwar der wichtigste Faktor bei der Entwicklung von Arzneimittelunverträglichkeiten ist, es aber zusätzliche Faktoren geben muss, die für die individuelle Ausprägung dieser Wirkungen eine Rolle spielen. In Frage kommen dabei beispielsweise genetische Variationen in Transportern, Rezeptoren und metabolisierenden Enzymen sowie Unterschiede in der Magen-Darm-Passage und anderen Verdauungsparametern.

4.4.1 Rückblickende Beurteilung des gewählten Modells

Der für den Versuchsteil „Neurotoxizität von Emodepsid“ gewählte Versuchsaufbau war zu Beginn der hier durchgeführten Studien bereits am Institut etabliert und ist erfolgreich in früheren Versuchen eingesetzt worden (*Janko und Geyer, 2012*).

Tiermodell

Die verwendeten PGP^{mut} Mäuse stellen insofern ein gutes Modell für die Zieltierart Hund dar, als dass es bei diesem Stamm ebenfalls durch eine natürliche Mutation im *mdr1a* Gen zum völligen Fehlen des MDR1-Transporters in der BHS kommt. Im Gegensatz zum Hund bildet das verbleibende *mdr1b* Gen der Mäuse allerdings den Transporter weiterhin in den entsprechenden Geweben (siehe 2.4.1.2). Obwohl dadurch keine 100%ig vergleichbare Situation entsteht, stimmt der wichtigste Faktor (kein MDR1-Transporter in der BHS) in beiden Spezies überein.

Auch die breite genetische Vielfalt der Hundepopulation wird durch einen Auszuchtstamm wie PGP^{mut} (und den korrespondierenden PGP^{WT} Stamm) gut repräsentiert. Diese Tatsache stellt allerdings auch einen Nachteil dar. Da sich die Tiere deswegen stark voneinander unterscheiden, reagieren sie unter Umständen auf Grund ihrer unterschiedlichen Genetik verschieden auf Testsubstanzen und Umweltbedingungen. Da dadurch die Streuung im Experiment ansteigt, erhöht sich im Allgemeinen auch die benötigte Tierzahl bzw. kann mit der gewählten Gruppengröße evtl. kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden. Bei einer Substanz wie EMO, welche offenbar über einen sehr komplexen Wirkmechanismus verfügt, der nach wie vor nur unzureichend aufgeklärt ist, könnte dieser Umstand eine noch größere Rolle spielen. Um grundlegende Mechanismen besser zu verstehen, könnte daher ein anderer Mausstamm gegebenenfalls eine Alternative darstellen, auch wenn dieser die Situation im Hund weniger repräsentativ abbildet. Es existieren weitere gentechnisch hergestellte *mdr1*-defekte Mauslinien, welche auf Inzuchtstämmen basieren. Zum einen sind dies die *mdr1a*-KO* Mäuse (kein MDR1-Transporter in der BHS und allen anderen entsprechenden Geweben – siehe 2.4.1.2), zum anderen die *mdr1ab*-KO** Mäuse (überhaupt kein MDR1-Transporter). Beide sind rückgekreuzt auf den Inzuchtstamm FVB, welcher allerdings in einigen Studien bei motorischen Aufgaben vergleichsweise schlecht abschneidet (Voikar et al., 2001; McFadyen et al., 2003; Bothe et al., 2004, 2005) und zu spontaner Hyperaktivität neigt bzw. eine sehr hohe Grundaktivität aufweist (Voikar et al., 2001; Bothe et al., 2004, 2005). Diese Umstände wiederum könnten sich bei Neurotoxizitätstest mit dem Rotarod als Nachteile herausstellen.

Es besteht auch ein Zusammenhang zwischen Geschlecht und Laufleistung auf dem Rotarod (McFadyen et al., 2003; Bothe et al., 2005), daher sollten entweder nur Tiere eines Geschlechts verwendet werden oder getrennte Gruppen beider Geschlechter. Die Geschlechtsabhängigkeit könnte auch auf einen möglichen Zusammenhang zur Körpergröße und Gewicht zurückzuführen sein. Je größer und schwerer ein Mausstamm desto schlechter ist tendenziell seine Leistung auf dem Rotarod. Da außerdem auch das Gewicht einen Einfluss auf die Laufleistung hat (Brooks und Dunnett, 2009; Pallier et al., 2009) und männliche Tiere eines Stammes in der Regel größer und schwerer sind als die Weibchen, könnte dies eine Ursache für die geringere Leistung von Böcken bei dieser Methode sein. Auch die in dieser Studie verwendeten CF1-Mäuse sind vergleichsweise groß. Das Gewicht der Tiere schwankte stark. Die weiblichen PGP^{mut} Mäuse waren mit durchschnittlich 44,43 g deutlich schwerer als die Durchschnittsmaus (weiblich = 18 – 35 g, männlich = 20 – 40 g) (Bogdanske et al., 2011). Die Tiere der PGP^{WT} Gruppe lagen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 28,65 g in der Mitte des angegebenen Bereichs.

Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist, dass MDR1 auch eine Rolle im Fettstoffwechsel zukommt, wodurch es beim Fehlen des Transporters zu einer stärkeren Gewichtszunahme kommen könnte (Foucaud-Vignault et al., 2011).

* (offizielle Bezeichnung: FVB.129P2-*Abcb1a*^{tm1Bor} N7;

weitere Informationen unter: <http://www.taconic.com/MDR1A>)

** (offizielle Bezeichnung: FVB.129P2-*Abcb1a*^{tm1Bor}*Abcb1b*^{tm1Bor} N12;

weitere Informationen unter: <http://www.taconic.com/1487>)

Rotarod Modell

Die verwendeten Rotarod Einstellungen (16 rpm, 2 min) sind einer Studie von Dawson et al., (2000) entnommen, in welcher antikonvulsive sowie unerwünschte Effekte unterschiedlicher Avermectin-Analoga getestet wurden. Da in unserem Institut in früheren Experimenten ebenfalls verschiedene Makrozyklische Laktone geprüft wurden, ist dieser Versuchsaufbau für diese Studien übernommen worden (Janko und Geyer, 2012). Die dabei aufgetretenen Symptome (vornehmlich Ataxie, des Weiteren Anzeichen von Inhibition wie Stupor) konnten mit dieser Methode zuverlässig gemessen und quantifiziert werden. Die durch EMO hervorgerufene Intoxikation stellte sich vornehmlich als Exzitation dar, welche sich nicht nur in Ataxie sondern vor allem durch einen gesteigerten Bewegungsdrang mit ungewöhnlichen Bewegungsabläufen zeigte. War die Ataxie deutlich ausgeprägt, konnte sie ebenfalls auf dem Rotarod gemessen werden. Die zusätzlichen Symptome, wie das häufige Aufstellen auf die Hintergliedmaßen, das Wippen des Kopfes und Vorderkörpers oder das viele hin- und herlaufen im Käfig, führten allerdings nur bedingt zu einer Einschränkung des Laufvermögens auf dem Rotarod. Zwar sank die Laufleistung dennoch in allen Fällen ab, allerdings nicht bei allen Tieren auf null. Einige der Tiere konnten sich relativ lange auf dem Rotarod halten und zeigten dabei die gleichen Symptome wie im Käfig, was aber nicht immer zum Herunterfallen im vorgegebenen Zeitfenster (2 min) führte. Die Umrechnung der Laufzeit in Punkte ermöglicht zwar eine Unterteilung der Laufperformance in „mit und ohne Beeinträchtigung“, dennoch stellte sich die Bewertung mit diesem Schema (siehe 2.4.3.2) in einigen Fällen als schwierig dar.

Gerade die Umrechnung der Laufzeiten in Punkte beinhaltet eine gewisse Subjektivität, vor allem in den Bereichen, in denen Beeinträchtigungen der Laufperformance nicht grundsätzlich zu Punktabzug führen, wie im Zeitintervall 1 – 2 min. Im Bereich bis 1 min ist beispielsweise die Vergleichbarkeit zwischen Tieren schwierig, die zwar im gleichen Zeitrahmen liegen aber unterschiedlich sicher auf dem Rotarod laufen. Laufen z.B. zwei Tiere zwischen 30 und 60 s, das eine aber schwankend und das andere nicht, müssten nach

dem hier verwendeten Bewertungsschema dennoch beide Tiere die gleiche Punktzahl erhalten (2 Punkte). Eine Abstufung zwischen diesen beiden Tieren vorzunehmen ist schwierig und führt gegebenenfalls zu einer persönlichen Auslegung des Bewertungsschemas z.B. durch die Vergabe von halben Punkten. Zwar wurden alle Tiere sowohl im Training als auch im Versuch nur von einer einzigen Person bewertet, eine Beurteilung der Laufzeit allein würde einer verbleibenden Subjektivität allerdings vorbeugen. Je nach Fragestellungen (Phänotypisierung, AM Tests, neurologische Erkrankungen, Gehirnläsionen u.a.) wird das Rotarod mit sehr unterschiedlichen Einstellungen verwendet. In aller Regel wird dabei aber ausschließlich die Zeit bis zum Herunterfallen der Tiere gemessen. Dabei steht das Rotarod entweder auf einer konstanten Geschwindigkeit wie im hier beschriebenen Versuch oder steigert seine Geschwindigkeit kontinuierlich. Eine kontinuierliche Steigerung der Geschwindigkeit hat sich dabei für einige Fragestellungen als sensibler erwiesen, da eine ständige Anpassung an neue Gegebenheiten eine größere Schwierigkeit der Koordination darstellt als das schnellere Laufen auf einer höheren Geschwindigkeit an sich (*Pallier et al., 2009*). Da dabei die Korrelationen mit dem Gewicht allerdings höher zu sein scheinen, können auch mehrere konstante Geschwindigkeiten unter Umständen bessere Ergebnisse liefern (*Brooks und Dunnett, 2009*). In mindestens einer anderen Studie zeigte sich allerdings auch eine gegenteilige Gewichtskorrelation (*Pallier et al., 2009*). Eine Entscheidung für eine der beiden Versionen (oder eine Kombination aus beiden) muss daher vermutlich für jede Fragestellung sorgsam abgewogen werden.

Im Rotarod Standard Operating Procedure (SOP) von EMPRESS (European Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens) wird beispielsweise eine Steigerung von 4 auf 40 rpm innerhalb von 5 min beschrieben, welche auch vielfältig Anwendung findet (*Crawley und Paylor, 1997; Crawley, 1999; Brooks und Dunnett, 2009*). Eine ausgiebige Trainingsphase wie im hier durchgeführten Versuch gibt es dabei nicht; die Tiere werden lediglich vor dem Versuch an die Apparatur und den Ablauf gewöhnt.

Der Vorteil dabei ist, dass die individuelle Laufleistung jedes einzelnen Tieres unabhängig von einer bestimmten zu erbringenden Leistung (hier: 2 min bei 16 rpm) bestimmt und mit dem Ausgangswert verglichen werden kann. So ist die Durchführung des Versuchs nicht davon abhängig, dass eine ausreichend große Anzahl Tiere die vorgeschriebene Leistung überhaupt erbringen kann und zwar zum gleichen Zeitpunkt. Die festgelegte Gruppengröße an Tieren mit zuverlässiger Performance zu erreichen, stellte sich im hier beschriebenen Versuch als schwierig dar. Vor allem in der Gruppe der PGP^{WT} Tiere fielen über die Hälfte der Tiere (62,1%) der Tiere bereits vor dem eigentlichen Versuch aus, da sie es nicht schafften die veranschlagte Zeit (2 min) bei der entsprechenden Drehgeschwindigkeit des Rotarods (16 rpm) zu laufen. Auch in der Gruppe der PGP^{mut} Mäuse erreichten viele Tiere (52,6%) nicht die vorgegebene Leistung. Ein Schema ohne festgelegte Zielparameter könnte

daher die Tierzahl ggf. reduzieren, da die meisten Tiere durchaus in der Lage waren zumindest eine gewisse Zeit lang bis zu einer bestimmten Geschwindigkeit auf dem Rotarod zu laufen. Die kontinuierliche Steigerung der Geschwindigkeit oder mehrere einzelne steigende Geschwindigkeiten könnten dabei den Faktor „Beeinträchtigung ja oder nein“ kompensieren, da Tiere mit noch vorhandener aber reduzierter Laufperformance aller Wahrscheinlichkeit nach nur geringere Geschwindigkeiten meistern können als unbeeinträchtigte Tiere und somit früher vom Rotarod herunter fallen. Eine sehr variable Dauer der Symptomatik wie im Fall von EMO könnte allerdings durch eine höhere individuelle Streuung evtl. dazu führen, dass auch bei einem anderen Rotarod Setup größere Gruppen und damit mehr Tiere nötig sind, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

In der vorliegenden Arbeit sollte außerdem insbesondere untersucht werden, ob die durch EMO hervorgerufenen Symptome vollständig reversible sind, was einen längeren Messzeitraum nötig macht. Um einen Beeinflussung der Laufperformance durch Lerneffekt während des Versuchszeitraums ausschließen zu können, ist zur Beantwortung dieser Fragestellung eine vorherige längere Trainingsphase notwendig. Nur so kann die vollständige Genesung ohne Einfluss von Lerneffekten quantifiziert und beurteilt werden.

Versuchsaufbau

Im hier gewählten Versuchsaufbau wurden die Tiere so jung wie möglich in den Experimentalraum verbracht um sich dort 2 Wochen zu akklimatisieren. Anschließend wurde mit dem Rotarod Training begonnen. Das Training fand dabei in aller Regel einmal am Tag statt, kurz vor Versuch maximal 3 Mal täglich. Alle Tiere wurden erst im Versuch eingesetzt, wenn sie in der Lage waren kontinuierlich (mindestens 1 Woche) 2 min bei 16 rpm auf dem Rotarod durchzulaufen. Da diese Leistung nach sehr verschiedenen Zeiträumen erreicht wurde, ergaben sich zu Versuchsbeginn Gruppen aus Tieren unterschiedlichen Alters. Außerdem gaben einige der Mäuse das Laufen auf dem Rotarod nach einiger Zeit aus unbekannten Gründen wieder auf, sodass es schwierig war, überhaupt eine ausreichend große Gruppe zusammen zu stellen. So ergab sich, vor allem in der Gruppe der WT Mäuse, insgesamt eine große Anzahl Tiere, die diese Leistung niemals erreichten oder nicht lange genug beibehalten konnten. So fielen mehr als 50% der Tiere bereits vor dem eigentlichen Versuch aus. Wie bereits diskutiert wurde, könnte die Anzahl benötigter Tiere ohne eine solche Trainingsphase und/oder durch ein anderes Rotarod Modell ggf. deutlich reduziert werden.

Zwar wurden alle Tiere während der Trainingsphase an Personen und Apparaturen gewöhnt, sodass während des Versuchs keine Beeinträchtigung durch unbekannte Bedingungen zu befürchten war, die Gegebenheiten im Versuch unterschieden sich aber dennoch vom Trainingsablauf. Die kurzen Messabstände von 2 Stunden mit bis zu 6 Messungen am Tag

erforderten natürlich das mehrfache Hantieren mit den Mäusen. Da die Wirkung von EMO sehr schnell eintrat und zum Teil nur wenige Stunden anhielt, waren diese Messabstände und häufigen Wiederholungen in diesem Fall aber notwendig, um dennoch Laufkurven erstellen zu können. Dabei konnte bei den letzten Messungen teilweise beobachtet werden, dass die Tiere aus Unwillen nicht mehr auf dem Rotarod laufen wollten. Eine Unterscheidung zu einer durch die Substanz ausgelöste Beeinflussung der Laufperformance war dabei allerdings in aller Regel dennoch möglich. Zukünftig könnten - vor allem in Kombination mit anderen Tests (siehe 4.4.1.4) – weniger Messungen stattfinden und die Laufleistung nicht als Kurve sondern als Einzelwerte z.B. in Balkendiagrammen ausgewertet werden.

Mögliche weitere Tests

Neurotoxische Substanzen können zu sehr komplexen Symptomatiken führen, welche nicht nur die Motorik sondern auch die Sensorik und das Verhalten beeinflussen können. Da das Nervensystem außerdem alle anderen Organsysteme steuert, kann die entsprechende Klinik oft nur schwer vorher gesagt werden, vor allem wenn Rezeptor und Wirkmechanismus der Testsubstanz nur unzureichend bekannt sind. Das Rotarod eignet sich dafür nicht als alleiniges Testsystem, um alle möglichen Ausprägungen neurologisch wirksamer Substanzen sicher festzustellen und zu quantifizieren. Eine Kombination aus mehreren Tests mit unterschiedlichen Schwerpunkten könnte daher aussagekräftigere Ergebnisse liefern (Crawley und Paylor, 1997; Crawley, 1999; Brooks und Dunnett, 2009; Wahlsten, 2011). Auch stammspezifische Stärken oder Schwächen bei einer bestimmten Aufgabe, könnten durch die Verwendung weiterer Tests kompensiert werden. Gleiches gilt auch für Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren.

Die Motorik bzw. Motorkoordination ist ein sehr komplexes Verhalten, welches eine funktionierende Sensorik, eine intakte Muskelfunktion, Lern- und Erinnerungsvermögen, Aufmerksamkeit und Motivation voraussetzt (Pallier et al., 2009).

Die Grundvoraussetzungen können daher vor den eigentlichen Experimenten durch allgemeine neurologische Tests geprüft werden. Dabei werden auch der allgemeine Gesundheitszustand und das normale Verhalten im Käfig ermittelt. (Crawley und Paylor, 1997; Crawley 1999; Brooks und Dunnett, 2009).

Das modified SHIRPA Verfahren (**S**mithKline Beecham, **H**arwell, **I**mperial College, **R**oyal London Hospital, **p**henotype **a**ssessment) ist eine Möglichkeit einen guten allgemeinen Überblick zu erhalten. Dabei werden verschiedenen Verhaltensweisen in einem Becherglas und einer speziellen Beobachtungsarena in einer bestimmten Reihenfolge und mit einem festgelegten Bewertungsschema beurteilt (Brooks und Dunnett, 2009; EMPRESS SOP modified SHIRPA).

Anschließend stehen verschiedene spezifische Untersuchungen zur motorischen Aktivität und zur Motorkoordination zur Verfügung. Da diese sehr vielseitig sind, soll im Folgenden nur auf einige Beispiele näher eingegangen werden, um einen Überblick zu gewährleisten.

Die Grundaktivität, das Erkundungsverhalten sowie eine mögliche Beeinflussung dieser Verhaltenseigenschaften durch Angst, können beispielsweise im Open Field untersucht werden. Die Maus wird dabei in die Mitte einer definierten Fläche gesetzt und darf sich eine bestimmte Zeit frei auf dieser Fläche bewegen. Dabei werden die zurückgelegte Strecke, die Anzahl an Überquerungen bestimmter Einteilungslinien und die Zeit in der Mitte bzw. am Rand ausgewertet und einander gegenübergestellt (Wahlsten, 2011; Crawley und Paylor, 1997; Crawley 1999; Brooks und Dunnett, 2009).

Beim Balance Beam laufen die Mäuse von einer Startplattform aus über verschieden dicke Stäbe unter Lichteinstrahlung in eine dunkle Zielbox. Verschiedene Modifikationen wie z.B. ein schräger Stab (Mäuse laufen tendenziell gerne nach oben) sind möglich. Dokumentiert und ausgewertet werden die Zeit beim Überqueren der Stäbe und das Ausrutschen der Hinterpfoten (Carter et al., 2001; Brooks und Dunnett, 2009; Wahlsten, 2011). Teilweise hat sich diese Methode als dem Rotarod überlegen heraus gestellt, da sie manche Beeinträchtigungen (Bsp.: Koordinationsstörungen durch Benzodiazepine) früher erfasst (Stanley et al., 2005).

Die Foot Print Analysis wertet den Gang anhand von Pfotenabdrücken auf Papier aus. Dabei werden u.a. Schrittlänge, Überlappungen der Vorder- und Hintergliedmaße und die Abstände der Hinterpfoten zueinander analysiert. Die Pfoten der Tiere werden dazu vorher mit verschiedenen Farben für Vorder- und Hinterpfoten versehen. Diese Methode stellt sehr einfach und effektiv Beeinträchtigungen des Ganges und damit der Motorkoordination dar (Crawley und Paylor, 1997; Carter et al., 2001; Brooks und Dunnett, 2009).

Zur Überprüfung der Sensorik, Muskelfunktion und Balance gibt es verschiedene Tests auf Gittern, die gerade oder schräg stehen und gedreht werden oder nicht. Dabei kann geprüft werden, ob das Tier klettert, ob es dabei mit den Pfoten zwischen die Gitterstäbe rutscht und ob und wie lange es sich am Gitter festhalten kann, wenn dieses gedreht wird (Brooks und Dunnett, 2009; Wahlsten, 2011).

Ein spezifischer Test der Muskelfunktion ist der Grip Strength Test. Dabei hält sich das Tier mit den Vorderpfoten an einem Gitter fest. Anschließend wird vorsichtig an der Schwanzwurzel gezogen, wobei die Muskelstärke gemessen wird. Die maximale Muskelstärke ist erreicht, wenn die Maus los lässt (Brooks und Dunnett, 2009; Wahlsten, 2011). Auch Varianten zur Messung sowohl der Vorder- als auch der Hintergliedmaßen sind möglich (EMPRESS SOP Grip Strength Test).

Bei der Verwendung mehrerer Tests in einem Versuch ist zu beachten, dass diese sich zwar ergänzen aber auch gegenseitig beeinflussen können. Die Reihenfolge der Tests sowie die Abstände zwischen den einzelnen Experimenten sollte daher sorgfältig je nach genauer Fragestellung abgewogen werden. Um eine gegenseitige Beeinflussung der Versuche möglichst gering zu halten, ist es von Vorteil mit dem am wenigsten belastenden Test zu beginnen. Sollten sich einige Tests als nicht kompatibel miteinander erweisen, können mehrere Tiergruppen eingesetzt werden, die dann jeweils nicht alle Tests durchlaufen. Bei länger andauernden Tests sind unter Umständen auch Lerneffekte und eine Korrelation zum Alter sowie zu einer Zunahme des Gewichts für einige Tests zu beachten (Wahlsten, 2011).

Abschließende Beurteilung zur Erfassung der Symptomatik bei EMO Intoxikation

Durch die hier durchgeführten *in vivo* Versuche konnte der vermutete Zusammenhang zwischen dem Fehlen des MDR1-Transporters in der BHS und der vermehrten Penetration von EMO ins ZNS nachgewiesen werden. Auch die dadurch begründete Neurotoxizität der Substanz ließ sich so nachweisen. Da im Versuch nur EMO und nicht die Retardformulierung Profender® mit EMO und PZQ verwendet wurde, können die aufgetretenen Symptome in diesem Fall auch klar auf eine Substanz zurückgeführt werden. Mögliche weitere Symptome oder eine Verschlimmerung der klinischen Ausprägung durch die gleichzeitige Applikation von PZQ wurden allerdings nicht getestet und können daher nicht ausgeschlossen werden.

Unerwartet war der deutliche Effekt von EMO in der empfohlenen Mindest-Dosis. Die ursprünglich geplante Dosis-Steigerung von 1 mg/kg bis zum Einsetzen der neurotoxischen Wirkung erübrigte sich daher. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die Mäuse vor der Applikation der Testsubstanz lediglich eine Stunde lang keinen Zugang zu Futter hatten, also nicht nüchtern waren. Nach der Applikation stand während des kompletten Versuches Futter ad libitum zur Verfügung und die Futteraufnahme wurde nicht kontrolliert. Zwar lag EMO als Reinsubstanz und nicht als Retardformulierung vor, dessen Löslichkeit könnte aber dennoch von Verdauungsparametern abhängig sein. Die Anwesenheit der an der Verdauung beteiligten Gallensäuren erhöht beispielsweise die Löslichkeit von EMO (Lange, 2011).

Neue Erkenntnisse in Bezug auf den Wirkmechanismus oder daran beteiligte Neurotransmittersysteme konnten auch im *in vivo* Säugermodell nicht gewonnen werden. Dies wäre evtl. denkbar durch einen Therapieversuch. Dabei würden nach der Applikation von EMO in Frage kommende Therapeutika injiziert und eine mögliche Verbesserung der Symptomatik in diesem und/oder einem erweiterten Versuchsaufbau gemessen. Würde bei diesem Ansatz eine Substanz mit bekanntem Wirkmechanismus die durch EMO hervorgerufene Symptomatik verbessern, könnte dies einen Hinweis auf beteiligte Rezeptoren, Transmittersysteme und/oder Signalwege geben.

Dabei ist zu beachten, dass auch die Therapeutika selber einen Einfluss auf die entsprechenden Tests haben können. So vermindern beispielsweise Benzodiazepine dosisabhängig die Laufleistung auf dem Rotarod (*Stanley et al., 2005*).

Grundsätzlich eignet sich der gewählte Mausstamm als Modell für die Zieltierart Hund. Allerdings ist die Symptomatik in beiden Spezies unterschiedlich ausgeprägt und nur einige der Symptome entsprechen einander (z.B. die Ataxie). Ideal wäre die Symptomatik direkt in der Zieltierart zu beobachten. Auch ein Therapieversuch könnte theoretisch direkt am Hund durchgeführt werden. Allerdings müssten für diese Fragestellung zunächst entsprechende Testverfahren für den Hund etabliert werden.

Weitere Mausstämme, die sich auf Grund ihres Inzuchtcharakters untereinander nur minimal unterscheiden, könnten eine Alternative darstellen, um die durch die individuelle Reaktion auf die Substanz verursachte Streuung zu reduzieren.

Weiterhin wäre ein Versuchsaufbau aus einer Kombination mehrerer Test mit unterschiedlichen Schwerpunkten (Motorik, Sensorik, Verhalten) vermutlich sinnvoller, um am Ende aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten. Durch die Verwendung mehrerer Tests könnten Schwachpunkte bei einem der Tests selber oder bei der Leistung des eingesetzten Mausstammes in einem der Tests ausgeglichen werden.

Um die unter Umständen sehr vielfältige klinische Symptomatik durch neurotoxische Substanzen besser messen zu können, empfiehlt sich zukünftig eine Kombination mehrerer Tests mit unterschiedlichen Schwerpunkten. Diese sollten Motorik, Sensorik und Verhalten abdecken und objektiv quantifizieren können.

Grundsätzlich sollte dabei für jeden Test der Basiswert (normales Verhalten) ermittelt werden und der Beobachtungszeitraum genau definiert werden (z.B. Anzahl Aufrichten pro Minute).

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit konnte durch den gewählten Versuchsaufbau beantwortet werden, allerdings sollte bei zukünftigen Versuchen abgewogen werden, welche der oben erwähnte Aspekte dazu beitragen könnten, den Versuchsablauf zu verbessern, die Tierzahl zu reduzieren und aussagekräftigere Ergebnisse zu erzielen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Aufdeckung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem MDR1-Genotyp und dem Auftreten von Arzneimittelunverträglichkeiten nach der Anwendung von Profender® beim Hund. Solche Arzneimittelunverträglichkeiten wurden unserem Institut in den letzten Jahren im Rahmen der MDR1-Diagnostik häufig gemeldet.

Durch eine retrospektive Auswertung dieser gesammelten Fälle ist es gelungen den vermuteten Zusammenhang zum MDR1-Genotyp der betroffenen Tiere aufzudecken und durch weitere *in vitro* und *in vivo* Versuche zu bestätigen.

Durch Transportversuche an spezifischen Zelllinien konnte eine Interaktion von dem in Profender® enthaltenen Emodepsid mit dem MDR1-Transporter des Hundes belegt werden. Anschließende Versuche an MDR1-defekten Mäusen zeigten deutlich eine vermehrte Gehirnpenetration von Emodepsid beim Fehlen von MDR1 in der Blut-Hirn-Schranke und eine damit verbundene Neurotoxizität *in vivo*.

Besonders auffällig waren in diesem Zusammenhang Störungen der Muskelkoordination, welche sich beim Hund hauptsächlich als Zittern äußerten. Auch Ataxie trat häufig auf. Koordinationsstörungen konnten auch bei der Maus beobachtet und mit Hilfe des gewählten Models (Rotarod) zuverlässig quantifiziert werden. Der direkte Vergleich mit den MDR1-intakten Wildtyp-Tieren, in denen keinerlei Symptome auftraten, belegte einen Zusammenhang zwischen Emodepsid-induzierter Neurotoxizität und dem Fehlen von MDR1 in der Blut-Hirn-Schranke.

Die beobachteten Symptome weisen dabei sowohl bei Hunden als auch bei Mäusen auf eine Übererregung des zentralen Nervensystems bzw. eine gestörte Balance zwischen erregenden und hemmenden Strukturen hin, wobei der Toxizitätsmechanismus zum jetzigen Zeitpunkt nicht genau bekannt ist. Wahrscheinlich ist ein komplexes Vergiftungsgeschehen mit Beteiligung mehrerer Neurotransmittersysteme.

Obwohl bisher keiner der uns bekannten Fälle letal verlief und alle Symptome auch ohne Behandlung vollständig wieder abklangen, wurde dennoch oft von einem lang andauernden und/oder schwerwiegenden Verlauf berichtet. In der tierärztlichen Praxis empfiehlt sich daher vor der Anwendung von Profender® beim Hund ein Test auf das Vorliegen des MDR1-Defekts, um die Applikation bei MDR1-defekten Hunden mit besonderer Sorgfalt durchzuführen. Bestehen dabei Zweifel an der korrekten Umsetzung durch den Besitzer, sollte ggf. auf ein anderes Präparat zurückgegriffen werden.

5 Summary

The aim of the present study was to find a possible relationship between the MDR1-genotype and drug intolerances after the administration of Profender® in dogs. Drug intolerances after administration of Profender® in dogs were reported to our institute pretty often in the last few years in the context of MDR1-genotyping.

In a retrospective evaluation of those cases we were able to detect the supposed relationship between the MDR1-genotype of the affected dogs, which was confirmed in further in vitro and in vivo experiments.

Transport studies in MDR1-expressing cell lines proved an interaction of emodepside (contained in Profender®) and the canine MDR1-transporter. Subsequent studies in MDR1-deficient mice showed a clear increase of emodepside brain penetration and correlated neurotoxicity in the absence of MDR1 in the blood-brain barrier in vivo.

This neurotoxicity mainly led to tremor and ataxia in affected dogs. Also the mice showed ataxia, which was reliably quantified with the model used in the present study (rotarod setup). As no symptoms were observed in the corresponding MDR1-intact wildtype mouse strain, an association between the absence of MDR1 in the blood-brain barrier and Emodepside-induced neurotoxicity can be drawn.

The observed symptoms in dogs and mice suggest an over-excitation of the central nervous system respectively an imbalance of excitation and inhibition. However the mechanism of toxicity remains unclear. Most likely this mechanism is very complex and involves different neurotransmitter systems.

Although none of the drug intolerances reported to our institute was lethal and all symptoms resolved completely without treatment, many cases showed a long lasting and/or severe course.

Therefore, MDR1-genotyping is recommended before the use of Profender® in the veterinary practice to perform drug administration with particular care in MDR1-deficient (MDR1^{-/-}) dogs. If a correct drug administration cannot be guaranteed by the owner another type of formulation might be a better choice.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott, N.J.; Patabendige, A.A.K.; Dolman, D.E.M.; Yusof, S.R.; Begley, D.J. (2010) Structure and function of the blood-brain-barrier; *Neurobiol Dis*, 37, 13-25
- Ballabh, P.; Braun, A.; Nedergaard, M. (2004) The blood-brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications; *Neurobiol Dis*, 16, 1-13
- Baronsky, J.; Bongaerts, S.; Traebel, M.; Weiss, H.-C.; Urbanetz, N. (2009) The study of different solid forms of Emodepside; *Eur J Pharm Biopharm*, 71, 88-99
- Bogdanske, J.J.; Hubbard-Van Stelle, S.; Riley, M.R.; Schiffmann, B.M. (2011) Laboratory Mouse – Procedural Techniques; 1. Auflage; ISBN: 978-1-4398-5042-8
- Bothe, G.W.M.; Bolivar, V.J.; Vedder, M.J.; Geistfeld, J.G. (2004) Genetic and behavioral differences among five inbred mouse strains commonly used in the production of transgenic and knockout mice; *Genes, Brain and Behavior*, 3, 149-457
- Bothe, G. W. M.; Bolivar, V. J.; Vedder, M. J.; Geistfeld, J. G. (2005) Behavioral differences among fourteen inbred mouse strains commonly used as disease models; *Comp Med*, 55, 326-334
- Boucard, A.A.; Ko, J.; Südhof, T.C. (2012) High Affinity Neurexin Binding to Cell Adhesion G-protein-coupled Receptor C1RL1/Latrophilin-1 Produces an Intercellular Adhesion Complex; *J Biol Chem*, 287, 9399–9413
- Brooks, S.P.; Dunnett, S.B. (2009) Tests to assess motor phenotype in mice : a user's guide; *Nat Rev Neurosci*, 10, 519-529
- Bull, K.; A. Cook, A.; Hopper, N.A.; Harder, A.; Holden-Dye, L.; Walker, R.J. (2007): Effects of the novel anthelmintic emodepside on the locomotion, egg-laying behaviour and development of *Caenorhabditis elegans*; *Int J Parasitol*, 37, 627-636
- Burnstock, G. (2004) Cotransmission; *Curr Opin Pharmacol*, 4, 47-52.
- Carter, R.J.; Morton, J.; Dunnett, S.B. (2001) Motor coordination and balance in rodents; *Current Protocols in Neuroscience*, DOI:10.1002/0471142301.ns0812s15.
- Cioli, D.; Pica-Mattoccia, L. (2003) Praziquantel; *Parasitol Res*, 90, 53-59
- Crawley, J.N.; Paylor, R. (1997) A Proposed Test Battery and Constellations of Specific Behavioral Paradigms to investigate the Behavioral Phenotype of Transgenic Knockout Mice; *Horm Behav*, 31, 197-211
- Crawley, J.N. (1999) Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests; *Brain Res*, 835, 18-26

- Crisford, A.; Murray, C.; O'Connor, V.; Edwards, R.J.; Krüger, N.; Welz, C.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Harder, A.; Walker, R.J.; Holden-Dye, L. (2011) Selective toxicity of the anthelmintic emodepside revealed by heterologous expression of human KCNMA1 in *Caenorhabditis elegans*; *Mol Pharmacol*, 79, 1031-1043.
- Davies, A.G.; Pierce-Shimomura, T.; Kim, H.; VanHoven, M.K.; Thiele, T.R.; Bonci, A.; Bargmann, C.I.; McIntire, S.L. (2003) A Central Role of BK Potassium Channels in Behavioral Responses to Ethanol in *C. elegans*; *Cell*, 115, 655-666
- Dawson, G.R.; Wafford, K.A.; Smith, A.; Marshall, G.R.; Bayley, P.J.; Schaeffer, J.M.; Meinke, P.T.; McKernan, R.M. (2000) Anticonvulsant and Adverse Effects of Avermectin Analogs in Mice Are Mediated through the γ -Aminobutyric AcidA Receptor; *J Pharmacol Exp Ther*, 295, 1051-1060
- Dayan, A.D. (2003) Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics; *Acta Trop*, 86, 141-159
- Derendorf, H.; Gramatte, T.; Schäfer, H.G.; Staab, A. (2011) Pharmakokinetik kompakt; 3. Auflage; ISBN: 978-3-8047-2450-1
- Dornetshuber, R.; Kamyar, M.R.; Rawnduzi, P.; Baburin, I.; Kouri, K.; Pilz, E.; Hornbogen, T.; Zocher, R.; Berger, W.; Lemmens-Gruber, R. (2009) Effects of the anthelmintic drug PF1022A on mammalian tissue and cells; *Biochem Pharmacol*, 77, 1437-1444.
- Du, W.; Bautista, J.F.; Yang, H.; Diez-Sampedro, A.; You, S.-A.; Wang, L.; Kotagal, P.; Lüders, H.O.; Shi, J.; Cui, J.; Richerson, G.B.; Wang, Q.K. (2005) Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorders; *Nat Genet*, 37, 733-738
- Dupuy, J.; Alvinerie, M.; Menez, C.; Lespine, A. (2010) Interaction of antihelminthic drugs with P-glycoprotein in recombinant LLC-PK1-mdr1a cells; *Chem Biol Interact*, 186, 280-286
- Eisenblätter, T., Hüwel, S., Galla, H.-J. (2003) Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier; *Brain Res*, 971, 221-231
- EMA (1996) Praziquantel – Summary Report;
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015784.pdf
- EMA (2005) Profender – Scientific Discussion;
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/veterinary/000097/WC500063849.pdf (zuletzt geändert: 14.12.2008)
- EMA (2008) Profender – Fachinformation in Form der Zusammenfassung der Merkmale des Tierarzneimittels; http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-

_Product_Information/veterinary/000097/WC500063851.pdf (zuletzt geändert:
01.07.2014)

EMA (2011) Procox – Scientific Discussion;

[http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-
_Scientific_Discussion/veterinary/002006/WC500106175.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/veterinary/002006/WC500106175.pdf)

Emodepsid Sicherheitsdatenblatt (nach EG-Verordnung 1907/2006); Version 3.0; überarbeitet
am 28.10.2010; Druckdatum: 01.07.2011; Firma: KVP Pharma+Veterinär- Produkte
gmbH, Projensdorfer Str. 324, D-24106 Kiel

Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Förstermann, U.; Starke, K. (Herausgeber) (2001)
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; 8. Auflage; ISBN: 3-437-
42520-X

Foucaud-Vignault, M.; Soayfane, Z.; Ménez C.; Bertrand-Michel, J.; Martin, P.G.; Guillou, H.;
Collet, X.; Lespine, A. (2011) P-glycoprotein dysfunction contributes to hepatic steatosis
and obesity in mice; *PLoS One*, 6, e23614 (DOI: 10.1371/journal.pone.0023614)

Frohberg, H.; Schulze Schencking, M. (1981) Toxicological profile of praziquantel, a new drug
against cestode and schistosome infections, as compared to some other
schistosomicides; *Arzneimittelforschung*, 31, 555-565

Fromm, M. F. (2000): P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS
accumulation of drugs; *Int J Clin Pharmacol Ther*, 38, 69-74.

Geyer, J.; Döring, B.; Godoy, J.R.; Moritz, A.; Petzinger, E. (2005a): Development of a PCR-
based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a
moxidectin-sensitive Australian Shepherd; *J Vet Pharmacol Ther*, 28, 95-99.

Geyer, J.; Döring, B.; Godoy, J.R.; Leidolf, R.; Moritz, A.; Petzinger, E. (2005b): Frequency of
the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany; *J Vet
Pharmacol Ther*, 28, 545-551.

Gramer, I.; Leidolf, R.; Döring, B.; Klintzsch, S.; Kramer, E.M.; Yalcin, E.; Petzinger, E.; Geyer,
J. (2011) Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs; *Vet J*, 189, 67-
71.

Graudins, A.; Stearman, A.; Chan, B. (1998) Treatment of serotonin syndrome with
cyproheptadine; *J Emerg Med*, 16, 615-619

Guest, M.; Bull, K.; Walker, R.J.; Amliwala, K.; O'Connor, V.; Harder, A.; Holden-Dye, L.;
Hopper, N.A. (2007): The calcium-activated potassium channel, SLO-1, is required for
the action of the novel cyclo-octadepsipeptide anthelmintic, emodepside, in
Caenorhabditis elegans; *Int J Parasitol*, 37, 1577-1588.

Gwaltney-Brant, S.M.; Albretsen, J.C.; Khan, S.A. (2000) 5-Hydroxytryptophan toxicosis in
dogs: 21 cases (1989-1999); *J Am Vet Med Assoc*, 16, 1937-1940

- Haberzettl, R.; Bert, B.; Fink, H.; Fox, M.A. (2013) Animal models of the serotonin syndrome: A systematic review; *Behav Brain Res*, 256, 328-345
- Harder, A.; von Samson-Himmelstjerna, G. (2002) Cyclooctadepsipeptides - a new class of anthelmintically active compounds; *Parasitol Res*, 88, 481-488.
- Harder, A.; Holden-Dye, L.; Walker, R.; Wunderlich, F. (2005) Mechanisms of action of emodepside; *Parasitol Res*, 97, 1-10
- Holden-Dye, L.; O'Connor, V.; Hopper, N.A.; Walker R.J.; Harder, A.; Bull, K.; Guest, M. (2007): SLO, SLO, quick, quick, slow: calcium-activated potassium channels as regulators of *Caenorhabditis elegans* behaviour and targets for anthelmintics; *Invert Neurosci*, 7, 199-208
- Holden-Dye, L.; Crisford, A.; Welz, C.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Walker, R.J.; O'Connor, V. (2012) Worms take to the slo lane: a perspective on the mode of action of emodepside; *Invert Neurosci*, 12, 29-36
- Hsiao P.; Sasongko, L.; Link, J.M.; Mankoff, D.A.; Muzi, M.; Collier, A.C.; Unadkat, J.D. (2006), Verapamil P-glycoprotein transport across the rat blood-brain barrier: cyclosporine, a concentration inhibition analysis, and comparison with human data; *J Pharmacol Exp Ther*, 317, 704-710
- Janko, C.; Geyer, J. (2012) Moxidectin has a lower neurotoxic potential but comparable brain penetration in P-glycoprotein-deficient CF-1 mice compared to ivermectin; *J Vet Pharmacol Ther*, 36, 275-284.
- Jelinek, G.A. (1997) Widow spider envenomation (latrodectism): A worldwide problem; *Wilderness Environ Med*, 8, 226-231
- Krüdewagen, E.M; Schimmel, A. (2011) Concomitant Simultaneous and Consecutive Treatment of Imidacloprid/Moxidectin Spot-On with Emodepside/Praziquantel Tablets in Adult Dogs; *Intern J Appl Res Vet Med*, 9, 290-299
- Krücken, J.; Harder, A.; Jeschke, P.; Holden-Dye, L.; O'Connor, V.; Welz, C.; von Samson-Himmelstjerna, G. (2012) Anthelmintic cyclooctadepsipeptides: complex in structure and mode of action; *Trends Parasitol*, 28, 385-394
- Krüger, N.; Harder, A.; von Samson-Himmelstjerna, G. (2009) The Putative Cyclooctadepsipeptide Receptor Depsiphilin of the Canine Hookworm *Ancylostoma caninum*; *Parasitol Res*, 105, 91-100
- Lange, P. (2011) Emodepsid – Bestimmung des Resorptionsortes und Formulierungskonzepte zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit; Inaugural-Dissertation; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; math.-naturwiss. Fak; URN: urn:nbn:de:hbz:061-20120419-091614-4.

- Lankas, G.R.; Cartwright, M.E.; Umbenhauer, D. (1997) P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity; *Toxicol Appl Pharmacol*, 143, 357-365
- Laupeze, B., Amiot, L., Payen, L., Drenou, B., Grosset, J.-M., Lehne, G., Fauchet, R., Fardel, O. (2001) Multidrug resistance protein (MRP) activity in normal mature leukocytes and CD34-positive hematopoietic cells from peripheral blood; *Life Sci*, 68, 1323-1331
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent; *J Biol Chem*, 193, 265-275
- Martin, R.J.; Buxton, S.K.; Charvet, C.N.; Robertson, A.P. (2011) Emodepside and SLO-1 potassium channels: A review; *Exp Parasitol*, 132, 40-46
- Martinez, A. F.; Muenke, M.; Arcos-Burgos, M. (2011): From the black widow spider to human behavior: Latrophilins, a relatively unknown class of G protein-coupled receptors, are implicated in psychiatric disorders; *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 156B:1-10.
- Matushita, H.; Lelianova, V.G.; Ushkaryov, Y.A. (1999) The latrophilin family: multiply spliced G protein-coupled receptors with different distribution; *FEBS Lett.*, 443, 348-352
- McFadyen, M.P.; Kusek, G.; Bolivar, V.J.; Flaherty, L. (2003) Differences among eight inbred strains of mice in motor ability and motor learning on a rotarod; *Genes, Brain and Behavior*, 2, 214-219
- Mealey, K. L.; Bentjen, S. A.; Gay, J. M.; Cantor, G. H. (2001): Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene; *Pharmacogenetics*, 11, 727-733
- Mealey, K.; Meurs, K.M. (2008) Breed distribution of the ABCB1-1 Δ (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping; *J Am Vet Med Assoc*, 233, 921-924.
- Mebs, D. (2010) Gifttiere; 3. Auflage; ISBN: 978-3-8047-2510-2
- Messerli, S.M.; Kasinathan, R.S.; Morgan, W.; Spranger, S.; Greenberg, R.M. (2009) *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility; *Mol Biochem Parasitol*, 167, 54-59
- Miltsch, S. M. ; Krücken, J. ;Demeler, J.; Janssen, I.J.; Krüger, N.; Harder, A.; von Samson-Himmelstjerna, G. (2012): Decreased emodepside sensitivity in unc-49 gamma-aminobutyric acid (GABA)-receptor-deficient *Caenorhabditis elegans*; *Int J Parasitol*, 42, 761-770.
- Modric, S.; Martinez, M. (2010) Patient variation in veterinary medicine – Part II – Influence of physiological variables; *J vet Pharmacol Therap*, 34, 209-233
- Mohammad-Zadeh, L.F.; Moses, L.; Gwaltney-Brant, S.M. (2008) Serotonin: A review; *J vet Pharmacol Therap*, 31, 187-199

- Mühlfeld, S.; Schmitt-Wrede, H.-P.; Harder, A.; Wunderlich, F. (2009) FMRFamide-like neuropeptides as putative ligands of the latrophilin-like HC110-R from *Haemonchus contortus*; *Mol Biochem Parasitol*, 164, 162-164
- Mühlhardt, C. (2009) Der Experimentator – Molekularbiologie/Genomics; 6. Auflage; ISBN: 978-3-8274-2036-7
- O'Sullivan, M.L.; de Wit, J.; Savas, J.N.; Comoletti, D.; Otto-Hitt, S.; Yates, J.R.; Ghosh, A. (2012) FLRT Proteins Are Endogenous Latrophilin Ligands and Regulate Excitatory Synapse Development; *Neuron*, 73, 903-910
- Osweiler, G.D.; Hovda, L.R.; Brutlag, A.G.; Lee, J.A. (Herausgeber) (2011) Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult – Clinical Companion – Small Animal Toxicology; 1. Auflage; ISBN: 978-0-8138-1985-3
- Pallier, P.N.; Drew, C.J.G.; Morton, A.J. (2009) The detection and measurement of locomotor deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease are task- and protocol-dependent: Influence of non-motor factors on locomotor function; *Brain Res Bull*, 78, 347-355
- Pauli-Magnus, C.; von Richter, O.; Burk, O.; Ziegler, A.; Mettang, T.; Eichelbaum, M.; Fromm M.F. (2000) Characterization of the major metabolites of verapamil as substrates and inhibitors of P-glycoprotein; *J Pharmacol Exp Ther*, 293, 376-82.
- Peterson, M.E. (2006) Black Widow Spider Envenomation; *Clin Tech Small Anim Pract*, 21, 187-190
- Pippert, T.R.; Umbenhauer, D.R. (2001) The subpopulation of CF-1 mice deficient in P-glycoprotein contains a murine retroviral insertion in the *mdr1a* gene; *J Biochem Mol Toxicol*, 15, 83-89
- Plumb, D.C. (2005) Plumb's Veterinary Drugs Handbook; 5. Auflage; ISBN-13: 978-0813805184; ISBN-10: 081380518X
- Polderman, A.M.; Gryseels, B.; Gerold, J.L.; Mpamila, K.; Manshande, J.P. (1984) Side effects of praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* in Maniema, Zaire; *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 78, 752-754
- Polli, J.W.; Wring, S.A.; Humphreys, J.E.; Huang, L.; Morgan, J.B.; Webster, L.O.; Serabjit-Singh, C.S. (2001) Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery; *J Pharmacol Exp Ther*, 299, 620-628
- Risau, W.; Wolburg, H. (1990) Development of the blood-brain-barrier; *TINS*, 13, 174-178
- Riviere, J.E.; Papich, M.G. (Herausgeber) (2009) Veterinary Pharmacology und Therapeutics; 9. Auflage; ISBN-13: 978-0813820613; ISBN-10: 0813820618
- Rubin, L.L.; Staddon, J.M. (1999) The Cell Biology of the Blood-Brain-Barrier; *Annu Rev Neurosci*, 22, 11-28

- Sabnis, S. (1999): Factors influencing the bioavailability of peroral formulations of drugs for Dogs; *Vet Res Commun*, 23, 425-447
- Saeger, B.; Schmitt-Wrede, H.-P.; Dehnhardt, M.; Benten, W.P.M.; Krücken, J.; Harder, A.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Wiegand, H.; Wunderlich, F. (2001) Latrophilin-like receptor from parasitic nematode *Haemonchus contortus* as a target for the anthelmintic depsipeptide PF1022A; *FASEB J*, 15, 1332-1334
- Sagawa, K.; Li, F.; Liese, R.; Sutton, S.C. (2009): Fed and fasted gastric pH and gastric residence time in conscious beagle dogs; *J Pharm Sci*, 98, 2494-2500
- Salkoff, L., A.; Butler, G.; Ferreira, C.; Santi, C.; Wei, A. (2006): High-conductance potassium channels of the SLO family; *Nat Rev Neurosci*, 7, 921-931
- Schinkel, A.H.; Mol, C.A.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Smit, J.J.; Borst, P. (1995a) Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice; *Eur J Cancer*, 31A, 1295-1298
- Schinkel, A.H.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Mol, C.A.; Borst, P. (1995b) Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A; *J Clin Invest*, 96, 1698-1705
- Silva, J. P.; Ushkaryov, Y.A. (2010): The latrophilins, "split-personality" receptors; *Adv Exp Med Biol*, 706, 59-75
- Silva, J.-P.; Lelianaova, V.G.; Ermolyuk, Y.S.; Vysokov, N.; Hitchen, P.G.; Berninghausen, O.; Rahman, M.A.; Zangrandi, A.; Fidalgo, S.; Toevitsky, A.G.; Dell, A.; Volynski, K.E.; Ushkaryov, Y.A. (2011) Latrophilin 1 and its endogenous ligand Lasso/teneurin-2 form a high-affinity transsynaptic receptor pair with signalling capabilities; *PNAS*, 108, 12113-12118
- Stanley, J.L.; Lincoln, R.J.; Brown, T.A.; McDonald, L.M.; Dawson, G.R.; Reynolds, D.S. (2005) The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines; *J Psychopharmacol*, 19, 221-227
- Thomas, D.E.; Lee, J.A.; Hovda, L.R. (2012) Retrospective evaluation of toxicosis from selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants: 313 dogs (2005-2010); *J Vet Emerg Crit Care*, 22, 674-661
- Trudeau, L.E.; Gutiérrez, R. (2007) On cotransmission & neurophenotype plasticity; *Mol Interv*, 7, 138-46.
- Twedt, D.C.; Cuddon, P.A.; Horn, T.W. (1999) Black Widow Spider Envenomation in a Cat; *J Vet Intern Med*, 13, 613-616
- Vergara, C.; Latorre, R.; Marrion, N.V.; Adelman, J.P. (1998) Calcium-activated potassium channels; *Curr Opin Neurobiol*, 8, 321-329
- Voikar, V.; Koks, S.; Vasar, E.; Rauvala, H. (2001) Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies; *Physiol Behav*, 72, 271-281

- von Samson-Himmelstjerna, G.; Harder, A.; Sangster, N.C.; Coles, G.C. (2005) Efficacy of two cyclooctadepsipeptides, PF1022A and emodepside, against anthelmintic-resistant nematodes in sheep and cattle; *Parasitology*, 130, 343-347
- Wahlsten, D. (2011) Mouse Behavioral Testing; 1. Auflage; ISBN: 978-0-12-375674-9
- Wang, Z.-W.; Saifee, O.; Nonet, M.L.; Salkoff, L. (2001) SLO-1 Potassium Channels Control Quantal Content of Neurotransmitter Release at the *C. elegans* Neuromuscular Junction; *Neuron*, 32, 867-881
- Wedel, K.; Wilke, A. (2008) Pharmakovigilanz im BVL – Risikomanagement am Beispiel der Permethrin-Intoxikation von Katzen; *J Verbr Lebensm*, 3, 449-454
- Welz, C.; Harder, A.; Schnieder, T.; Hoglund, J.; von Samson-Himmelstjerna, G. (2005): Putative G protein-coupled receptors in parasitic nematodes - potential targets for the new anthelmintic class cyclooctadepsipeptides?; *Parasitol Res*, 97, 22-32
- Verma, S.; Robertson, A.P.; Martin, R.J. (2009) Effects of SDPNFLRF-amide (PF1) on voltage-activated currents in *Ascaris suum* muscle; *Int J Parasitol*, 39, 315-326
- Willson, J.; Amliwala, K.; Harder, A.; Holden-Dye, L.; Walker, R.J. (2003): The effect of the anthelmintic emodepside at the neuromuscular junction of the parasitic nematode *Ascaris suum*; *Parasitology*, 126, 79-86
- Willson, J.; Amliwala, K.; Davis, A.; Cook, A.; Cuttle, M.F.; Kriek, N.; Hopper, N.A.; O'Connor, V.; Harder, A.; Walker, R.J.; Holden-Dye, L. (2004): Latrotoxin receptor signaling engages the UNC-13-dependent vesicle-priming pathway in *C. elegans*; *Curr Biol*, 14, 1374-1379
- Wolf, S.; Seehaus, B.; Minol, K.; Gassen, H.G. (1996) Die Blut-Hirn-Schranke: eine Besonderheit der cerebralen Mikrozirkulation; *Naturwissenschaften*, 83, 302-311
- Zhang, Y., Gupta, A.; Wang, H., Zhou, L., Vethanayagam, R.R., Unadkat, J.D., Mao, Q. (2005) BCRP Transports Dipyrindamole and is Inhibited by Calcium Channel Blockers; *Pharm Res*, 22, 2023-2034

Danksagungen

Ich danke **Gott!** Dafür, dass in meinem Leben immer alles so gekommen ist, wie ich es mir gewünscht habe und/oder wie es für mich am besten war.

Meiner „Büro-WG“ - Julia. Du warst zu jeder Zeit und in jeder Lage für mich da, nicht nur als Kollegin sondern auch – und das ist noch viel, viel besser – als Freundin. Ich hatte (und habe ☺) immer das Gefühl, mit dir kann ich alles schaffen. Und ich hoffe, ich habe es wenigstens ansatzweise geschafft, so für dich da zu sein, wie du für mich, zumindest habe ich es immer versucht. Du bist ein ganz toller Mensch, der unbedingt so bleiben sollte, wie er ist. Vielen, vielen Dank für alles! Jeder sollte eine Julia haben!

Katharina. Zum Glück habe ich alle anderen Angebote abgelehnt und hier für viel weniger Geld viel mehr gearbeitet, denn sonst hätte ich dich sehr wahrscheinlich nie kennen gelernt. Selbst wenn ich hier absolut nichts erreicht hätte, hätte sich alles allein schon deshalb gelohnt. Und ich hoffe, du bekommst irgendwann tatsächlich noch den Gefahrenzuschlag fürs Sabi-Sitten! Niemand hätte das besser hinkriegen können als du! Ich hab dich lieb! Und einen ganz besonderen Dank dafür, dass du mir eins der besten Geschenke gemacht hast, das ich je bekommen habe: meine „Schwester“ **Mone**, die du jetzt mit mir teilen musst! ☺

Jana. Du hast die Lücke in unserem Zimmer gefüllt. Zugegeben: bei uns ist erst mal jeder willkommen, aber du warst eindeutig der Hauptgewinn. Lass dich nicht unterkriegen, du bist super! Glaube niemandem, der was anderes behauptet!

Meinen Lehrern – Charlotte. Du bist definitiv einer meiner Lieblingsmenschen. Danke für deine Unterstützung im Kampf gegen die Übermacht von unlöslichen Substanzen, sterbenden oder gar nicht erst wachsenden Zellen und dem ach so schön bunten Rhodamin. Ich wünsche dir für immer nur das Beste und vor allem immer genug Panacotta! ☺

Christina. Ohne dich wäre ich nie so weit gekommen. Zumindest längst nicht so schnell, weil es sehr viel länger gedauert hätte über das „Aha-da-wo-der-Schwanz-ist-ist-hinten-und-da-wo-die-Ohren-sind-ist-vorne-und-jetzt-ist-es-vom-Tisch-gesprungen-und-verschwunden“-Stadium raus zu kommen ☺. Vielen Dank für deine Hilfe und Geduld!

Prof. Dr. Joachim Geyer. Danke Achim für dein Vertrauen und dafür, dass du mir diese Chance gegeben hast. Ich hab's nie bereut und ich hoffe, du auch nicht. Wir sind ein gutes Team. Danke für deine Hilfe und Unterstützung, v.a. beim Paper schreiben und für die Zeit und das Geld, das du in meine Fort- und Weiterbildung investiert hast!

Prof. Dr. Ernst Petzinger. Danke für die vielen lustigen und interessanten Geschichten aus dem Tierarzt-, Forscher- und Jägerleben, die uns nachhaltig im Gedächtnis geblieben sind und uns immer an Sie erinnern werden. Wir vermissen Sie!

Der **Bayer Animal Health GmbH** für ihre Unterstützung, insbesondere **Dr. Ralph Krebber** für die Analyse der Proben und die Mitwirkung an der Veröffentlichung.

Allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie. Jeder von euch hat auf seine Weise dazu beigetragen, dass die letzten paar Jahre die bisher besten meines Lebens waren.

Allen Mitarbeitern der Versuchstierhaltung – insbesondere Daniel und Manuela - für die Unterstützung bei der Unterbringung und Versorgung der Mäuse – vor allem an Wochenenden und Feiertagen. Ihr wart alle super!

Mama und Papa. Ihr habt mich immer unterstützt, OBWOHL ich Tierarzt werden wollte. Seit ich diese Entscheidung vor 24 Jahren im Kindergarten getroffen habe, habt ihr immer alles gegeben, um mir meinen Traum zu ermöglichen und wenn ihr mir nicht immer zur Seite gestanden hättet, wäre dieser Traum ganz sicher zum Albtraum geworden. **Basti.** Wir hatten es nicht immer leicht miteinander, aber inzwischen bin ich wirklich stolz sagen zu können: Das ist MEIN Bruder!!! **Lissy, Bonny, Rex, Funny und Leila**, die wesentlich zu meiner seelischen Gesundheit beigetragen haben. Außerdem habt ihr für genügend Abwechslung gesorgt, z.B. durch lebendige oder tote Mäuse und Vögel in meiner Wohnung sowie kreativen Notfälle wie gleich mehreren Volvuli, damit ich nicht aus der praktischen Übung komme - Ich liebe euch wirklich sehr (*„Bis jemand ein Tier geliebt hat, bleibt ein Teil seiner Seele unerweckt!“ – Anatole France*)

Möge die Macht mit euch allen sein !!!

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

„Neurotoxizität von Emodepsid in Abhängigkeit der MDR1-Expression in der Blut-Hirn-Schranke“

selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündliche Auskünfte beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Studien habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Sabrina Elmshäuser



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6322-1



9 783835 196322 1